

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES DE LOS  
TRASTORNOS DE LA PUBERTAD**

Nelmar Valentina Ortiz Cabrera

2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



Tesis Doctoral

**ESTUDIO DE LAS BASES MOLECULARES DE LOS  
TRASTORNOS DE LA PUBERTAD**

Nelmar Valentina Ortiz Cabrera

Bajo la dirección de:

Doctora María José Trujillo Tiebas

Profesor Leandro Soriano Guillén

2019

## **Agradecimientos**

Este trabajo de tesis doctoral es el resultado de mucho esfuerzo y dedicación no sólo por mi parte, sino de parte de todas las personas que me han ayudado a hacerlo posible, y por ello les estaré agradecida siempre. Mención especial debo hacer a mis directores de Tesis: el profesor Leandro Soriano y la Dra. María José Trujillo, que han sido mi ejemplo, inspiración y guía. Es un honor para mí haber contado con ustedes durante este arduo, emocionante y valioso camino.

A todo el Servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz por abrirme las puertas, recibirme y enseñarme todo lo que sé de Genética; los llevo a todos y cada uno en mi corazón.

A mi familia y amigos por apoyarme y por haberme dado las herramientas para poder embarcarme en todos los proyectos que he realizado.

A los pacientes porque todo este esfuerzo es por ellos y para ellos.

## **Abreviaturas**

ACMG:	Colegio Americano de Genética Médica
ACTH:	Corticotropina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Molécula de ácido ribonucleico mensajera
AVPV:	Núcleo periventricular anteroventral
CNV:	Cambio de número de copia
DEXA:	Densitometría de rayos X de energía dual
DHEA-S:	Dehidroepiandrostenediona sulfato
DHT:	Dihidrotestosterona
DI:	Discapacidad Intelectual
dNTPs:	Desoxinucleótidos
DUP:	Disomía uniparental
E:	Estradiol
ECLIA:	Ensayos electroquimioluminométricos
ECV:	Evento cardiovascular
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
E $\alpha$ :	Receptor de estradiol $\alpha$
FA:	Frecuencia alélica
FAM:	Carboxifluoresceína

FISH:	Hibridación in situ fluorescente
FSH:	Hormona foliculoestimulante
GABA:	Ácido gamma-aminobutírico
GH:	Hormona de crecimiento
GnRH:	Hormona liberadora de gonadotropina
GWAS:	Estudio de asociación del genoma completo
HCG:	Gonadotropina coriónica humana
HHPc:	Hipogonadismo hipogonadotrofo permanente congénito
HHPcn:	Hipogonadismo hipogonadotrofo permanente congénito sin alteración del olfato
HHP:	Hipogonadismo hipogonadotrofo permanente
HMG:	Gonadotropina menopáusica humana
HPTM:	Modificaciones postraduccionales de las histonas
IC:	Intervalo de confianza
ICMA:	Ensayos inmunoquimioluminiscentes
IFMA:	Ensayos inmunofluorométricos
IMC:	Índice de masa corporal
isla CpG:	Regiones del ADN con alta concentración de dinucleótidos CG
KNDy:	Kispeptina1, neurokinina B y dinorfina
LH:	Hormona luteinizante
LHRH:	Hormona liberadora de hormona luteinizante

lincARN:	Ácido ribonucleico no codificante intergénico largo
miRNA:	Molécula de ácido ribonucleico no codificante de pequeño tamaño con funciones reguladoras
MLPA:	Sonda dependiente de la ligadura múltiplex
NAD <sup>+</sup> :	Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleótido forma reducida
ncARN:	Ácido ribonucleico no codificante
ND:	Dato no disponible
NKB:	Neurokinina B
PcG:	Proteínas del complejo policombo
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
Pol II:	ARN polimerasa II
PPC:	Pubertad precoz central
PPCI:	Pubertad precoz central idiopática
PPM:	Pubertad precoz mixta
PPP:	Pubertad precoz periférica
PRL:	Prolactina
PSA-NCAM:	Molécula de adhesión neural del ácido polisiálico
PUBERE:	Registro español de pubertad precoz central
PWS:	Síndrome de Prader-Willi
QI:	Primer cuartil



QIII:	Tercer cuartil
RCIU:	Retraso del crecimiento intrauterino
RFRP:	Péptido relacionado a la RF-amida
RM:	Resonancia magnética
SDS:	Desviación estándar
SK:	Síndrome Kallmann
SNC:	Sistema nervioso central
STR:	Short Tandem Repeats
TGF $\beta$ :	Factor de crecimiento transformador tipo $\beta$
TGR:	Represor de crecimiento tumoral
TRIS:	Tris(hidroximetil)aminometano
TrxG:	Proteínas del complejo tritorax
TSH:	Tirotropina
TTF1:	Factor de transcripción tiroideo 1
Ub:	Ubiquitina
UPSIT:	Test para valoración del olfato
VN:	Valores normales
VUS:	Variante de significado clínico incierto
WES:	Estudio del exoma completo

**Resumen**

La pubertad es un proceso biológico complejo a través del cual se desarrollan los caracteres sexuales secundarios, se obtiene la maduración sexual completa y se alcanza la talla adulta. El hecho que marca el inicio puberal es la regularización e intensificación de la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por parte de las neuronas neurosecretoras hipotalámicas. Las alteraciones de este proceso se pueden manifestarse, entre otros, como: i) Pubertad precoz central idiopática (PPCI), cuando el proceso se inicia prematuramente a nivel hipotalámico, sin ninguna causa anatómica distinguible. ii) Hipogonadismo hipogonadotrofo permanente congénito (HHPc), cuando a nivel hipotalámico el proceso no se inicia a la edad estipulada o su progresión se estanca. Existen factores del individuo y del ambiente que pueden influir en estas alteraciones, entre ellos, factores genéticos que determinan la aparición de una u otra alteración.

Nuestro objetivo principal fue estudiar los genes relacionados con la producción de GnRH en pacientes con el diagnóstico de PPCI y en pacientes afectados de HHPc para determinar si existían alteraciones genéticas que pudiesen explicar el fenotipo de estos pacientes.

Observamos que en el grupo de pacientes con PPCI la prevalencia de alteraciones genéticas es muy baja. Por el contrario, la prevalencia de estas alteraciones en los pacientes de HHPc es lo suficientemente alta como para justificar su estudio en la práctica clínica diaria.

Puberty is a complex biological process. This process leads to the development of secondary sexual characteristics, reproductive capacity and final adult height. The fact that initiates puberty is the regularization and intensification of the pulsatile production of gonadotropin release hormone (GnRH) in hypothalamic neurosecretory neurons. Alterations in this process may present in multiple ways, two of them are: i) Idiopathic central precocious puberty (PPCI), this happens when the process is initiated prematurely in the hypothalamus without any distinguishable anatomical lesion. ii) Congenital permanent hypogonadotropic hypogonadism (HHPc), this happens when the process fails to be initiated at the hypothalamus or arrested at initial phases. There are individual and environmental factors that can lead to these alterations, between them, genetical factors that causes any of the alterations mentioned.

Our principal aim was to study genes related to the production of GnRH in patients diagnosed of PPCI and in patients affected of HHPc to determine if there was any genetic alteration that could explain the phenotype of these patients.

We observed that the prevalence of genetic alterations in patients with PPCI was very low. Instead, the prevalence of these alterations in patients with HHPc was high enough to consider this kind of studies in the clinical routine.

# Índice

## ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1.- Pubertad normal	
1.1 Definición	3
1.2 Neurorregulación	4
1.2.1 Estímulos trans-sinápticos	5
1.2.2 Estímulos gliales	8
1.3 Control epigenético	10
1.4 Control metabólico	12
1.5 Cambios físicos	15
1.6 Tendencia secular de la edad de inicio de la pubertad	17
2.- Pubertad patológica	
2.1 Pubertad precoz	18
2.1.1 Epidemiología PPC	18
2.1.2 Clasificación etiopatogénica de la PPC	19
2.1.2.1 Secundaria a alteraciones del SNC	20
2.1.2.2 Causas genéticas	20
2.1.2.3 Pubertad precoz central idiopática (PPCI)	27
2.1.3 Diagnóstico	27
2.1.3.1 Anamnesis y examen físico	27
2.1.3.2 Pruebas hormonales	27
2.1.3.3 Pruebas de imagen	28
2.1.3.4 Estudios genéticos	28
2.1.4 Problemas asociados a la PPC	28
2.1.5 Tratamiento de la PPC	30
2.2 Hipogonadismo	30
2.2.1 Clasificación etiopatogénica del hipogonadismo	30
2.2.2 Hipogonadismo Hipogonadotrofo Permanente (HHP)	31
2.2.2.1 Clasificación etiopatogénica del HHP con_	
génito	33
2.2.2.1.1 Síndrome Kallmann	34

2.2.2.1.2 Hipogonadismo hipogonadotropo permanente congénito HHPc sin alteración del olfato	40
2.2.3 Diagnóstico	41
2.2.3.1 Anamnesis y examen físico	41
2.2.3.2 Pruebas hormonales	42
2.2.3.3 Pruebas de imagen	43
2.2.3.4 Estudios genéticos	43
2.2.4 Problemas asociados	44
2.2.5 Tratamiento	44
3. Estudios genéticos	46
 HIPÓTESIS	 51
 OBJETIVOS	 55
 PACIENTES Y MÉTODOS	 59
1. Tipo de estudio	61
2. Lugar de realización	61
3. Población a estudio	61
3.1 Pubertad precoz central idiopática (PPCI)	61
3.2 Hipogonadismo hipogonadotropo permanente congénito aislado (HHPc)	62
3.3 Población control	64
4. Estudio hormonal	64
5. Estudios genéticos	65
5.1 Protocolo de obtención de ADN	65
5.2 Diseño de estudios genéticos	66
5.2.1 Secuenciación de nueva generación (NGS)	66
5.2.2 Secuenciación Sanger	67
5.2.3 Estudios para detectar cambios de número de copia	71
5.2.4 Estudio de la Disomía Uniparental materna del cromosoma 14, citobanda 14q32.2	74

6. Grupo PPCI	75
7. Grupo HHPc	78
8. Análisis estadístico	79
9. Aspectos éticos	79
RESULTADOS	81
1. Grupo PPCI	83
1.1 Descripción de la cohorte	83
1.2 Estudios hormonales	84
1.3 Estudios genéticos	88
1.3.1 Secuenciación masiva	88
1.3.2 Secuenciación Sanger	92
1.3.4 Estudio de cambio de número de copia	96
1.3.5 Estudio de la Disomía uniparental del cromosoma 14, citobanda 14q32.2	96
2. Grupo HHPc	98
Paciente 17-3252	98
Paciente 13-2928	99
Paciente JLDM	101
Paciente 18-0491	103
Paciente 18-3079	104
Paciente 18-3230	105
Paciente 17-3285	107
DISCUSIÓN	109
Grupo PPCI	112
Gen <i>MKRN3</i>	112
Gen <i>KISS1</i>	113
Gen <i>TACR3</i>	115
Otros genes analizados por NGS incluidos en el primer y segundo filtrado	116
Grupo HHPc	117
Gen <i>SOX10</i>	117
Gen <i>ANOS1</i>	118



## ÍNDICE

---

Gen <i>NSMF</i>	118
Gen <i>CHD7</i>	119
Gen <i>SEMA3A</i>	119
Futuro del estudio de la patología puberal	122
CONCLUSIONES	125
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
ANEXOS	143
1) Informe del comité ético de investigación clínica	145
2) Consentimiento informado	146
3) Resumen de las variantes encontradas por técnica de NGS en cada uno de los tres pipelines de análisis bioinformático	152
4) Estudio de la disomía uniparental materna cromosoma 14, citobanda 14q32.2: Haplotipos de las 28 familias estudiadas	162
5) Publicación indexada derivada de este trabajo	169
6) Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales	177

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la pubertad precoz según la etiopatogenia, adaptado de <i>Soriano et al</i> (52).	19
Tabla 2. Resumen de las variantes patogénicas en el gen <i>MKRN3</i> , publicadas hasta abril 2019.	25
Tabla 3. Clasificación del HH según su causa adaptado de <i>Soriano et al</i> (58).	32
Tabla 4. Resumen de las proteínas implicadas en la generación, migración y homeostasis de las neuronas productoras de GnRH. Se detalla la función de cada una, el gen que la codifica, los síntomas asociados a su disfunción, el patrón de herencia asociado a la misma, porcentaje que representan en la etiopatogenia del HHPc y si participan o no en la herencia oligogénica.	37
Tabla 5. Resumen de las proteínas implicadas en la homeostasis y secreción de GnRH. Se detalla la función de cada una, el gen que la codifica, los síntomas asociados a su disfunción, el patrón de herencia asociado a la misma, porcentaje que representan en la etiopatogenia del HHPc y si participan o no en la herencia oligogénica.	40
Tabla 6. Resumen y ejemplos con los tipos de mutaciones; no se incluyen grandes deleciones/duplicaciones, inversiones y traslocaciones.	49
Tabla 7. Resumen de las técnicas de medición de las hormonas, fundamento y límite inferior de detección.	65
Tabla 8. Clasificación de las variantes según los criterios de la ACMG, extraído de <i>Richards et al</i> (31)	67
Tabla 9. Fragmentos o exones amplificados cebadores y temperatura de alineamiento.	69

Tabla 10. Cantidades y proporciones de los reactivos y ADN utilizado en cada reacción de PCR.	70
Tabla 11a. Ciclos y temperaturas utilizados para cada fragmento amplificado.	70
Tabla 11b. Ciclos y temperaturas utilizados para la reacción de secuenciación.	71
Tabla 12. Listado de STRs estudiados, localización fluorocromo marcador, distancia en Mb a <i>DLK1</i> , fracción de heterocigosidad.	74
Tabla 13. Cantidad de cebador, ADN y necesaria para la PCR. Se utilizaron tubos de 0,2 ml con premezcla de tampón y enzima liofilizados.	75
Tabla 14. Resumen de la IMC, talla al diagnóstico en SDS, diferencia entre la edad cronológica y edad ósea de los pacientes en años y talla genética en SDS; talla de la madre y padre en cm y SDS, la edad de menarquia y edad de primer afeitado de los progenitores de los pacientes con PPCI.	85
Tabla 15. Estadio Tanner de cada uno de los pacientes del grupo PPCI.	86
Tabla 16. Se resume, la edad al diagnóstico, edad expresado en SDS, diferencia entre edad ósea (EO) y edad cronológica (EC), estadio puberal de Tanner (EP), valores basales y pico de LH, FSH, valores basales de testosterona y estradiol.	87
Tabla 17. Se resumen las variantes encontradas, en los 8 genes del primer filtrado del análisis de NGS (kit TSO), excepto el gen <i>MKRN3</i> . Se muestra la frecuencia alélica para el grupo estudiado, la cantidad de heterocigotos/homocigotos. En color rojo se muestra la frecuencia poblacional total (base de datos gnomAD). En color azul se muestra la frecuencia alélica en el grupo control (no todas las variantes fueron estudiadas en el grupo control).	91
Tabla 18. Resumen de las variantes encontradas en el gen <i>MKRN3</i> , que fue estudiado en 20 pacientes utilizando la técnica de NGS (kit TSO) y en 11 pacientes utilizando	

la técnica de secuenciación Sanger. En los 31 pacientes, la región promotora fue estudiada utilizando la técnica Sanger no encontrándose ninguna variante.	92
Tabla 19. Se resumen las variantes encontradas, en los 8 genes del segundo filtrado del análisis de NGS (kit TSO). Se muestra la frecuencia alélica para el grupo estudiado, la cantidad de heterocigotos/homocigotos. En color rojo se muestra la frecuencia poblacional total (base de datos gnomAD).	93
Tabla 20. Resumen con los polimorfismos de la región 3'UTR del gen <i>KISS1</i> estudiados en el grupo PPCI y en el grupo control. Se muestran los haplotipos construidos, su frecuencia alélica en los dos grupos y el <i>odds ratio</i> calculado para cada haplotipo.	95
Tabla 21. Resumen de las variantes encontradas en el gen <i>DLK1</i> , que fue estudiado en los 31 pacientes utilizando la técnica de secuenciación Sanger.	96
Tabla 22. Resumen de las variantes encontradas en cada uno de los pacientes del grupo HHPc.	108

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la edad de inicio de la pubertad.	3
Figura 2. Representación de la molécula de GnRH luego de las modificaciones post-traduccionales, adaptado de <i>Millar et al.</i> (9)	5
Figura 3. Representación del control del eje Hipotálamo-Hipófisis y de los estímulos que recibe la neurona productora de GnRH.	9
Figura 4. Esquema donde se plantea el control epigenético de los promotores de genes como KISS1 y TAC3. Adaptado del trabajo de <i>Lomniczi et al</i> (12). PcGs: Proteínas del grupo policombo. Pol II: ARN polimerasa. TrxGs: Proteínas del grupo tritórax. lincRNAs: ARN no codificante largo. HPTMs: modificaciones postraduccionales de las histonas.	12
Figura 5. Estadios puberales según Tanner(3,4). Imagen adaptada de <i>Carel et al</i> (53).	16
Figura 6. Representación del proceso de ubiquitinización. Adaptado de <i>Deshaies y Joazeiro</i> (74).	23
Figura 7. Representación de la proteína MKRN3 donde se muestran los dominios funcionales. En rojo dedo de zinc tipo C3H1, en verde el dedo de zinc Cys-His y en azul el dedo de zinc tipo C3HC4 RING, adaptado de <i>Abreu et al</i> (76).	23
Figura 8. Diagrama del “camino” que siguen las neuronas desde su generación en la placoda olfatoria hasta el hipotálamo. Se muestran los genes implicados en cada parte del proceso. Adaptado de <i>Mitchell et al</i> (110).	34
Figura 9. Esquema simplificado de los pasos de la secuenciación Sanger.	46
Figura 10. Pasos para la realización de la secuenciación de nueva generación, utilizando diferentes plataformas comerciales.	47

Figura 11. Pasos de la técnica de ME-MLPA	73
Figura 12. Algoritmo de trabajo para el grupo PPCI.	76
Figura 13. Distribución étnica de los pacientes con PPCI.	83
Figura 14. Genitograma de la familia PPCI-33. E1: c.1224_1228del. Figuras rellenas: afectados, figuras con círculo en el centro: portadores.	94
Figura 15. Ejemplo del haplotipo construido con los microsatélites estudiados. A) cuando teníamos a los 3 miembros de la familia. B) Cuando sólo teníamos 2 miembros de la familia. C) Familia con haplotipo no informativo.	97
Figura 16. Imagen de RM craneal con ausencia de bulbos olfatorios.	102

# Introducción

# 1.- Pubertad normal

## 1.1 Definición

La pubertad es un fenómeno biológico tremendamente complejo a través del cual se desarrollan los caracteres sexuales secundarios, se obtiene la maduración sexual completa y se alcanza la talla adulta (1). En los seres humanos, la pubertad se manifiesta no solamente en forma de cambios hormonales y físicos, sino también con cambios conductuales y psicológicos (2).

El primer signo corporal visible en las niñas es la aparición de la telarquia y, en los niños, el primer evento es el aumento del volumen testicular ( $> 4$  ml medido con el orquidómetro de Prader). Con posterioridad, comenzarán a aparecer de forma progresiva el resto de caracteres sexuales secundarios y, en paralelo, se incrementará el ritmo de crecimiento (2).

La definición de pubertad normal obedece a criterios puramente estadísticos. Es decir, la aparición de los caracteres sexuales secundarios se encuentra dentro del intervalo de  $\pm 2,5$  desviaciones estándar (SDS) para sexo y población de referencia. De esta forma, se considera una pubertad normal la que acontece entre los 8 y 13 años en niñas y entre 9 y 14 años en niños (3,4).

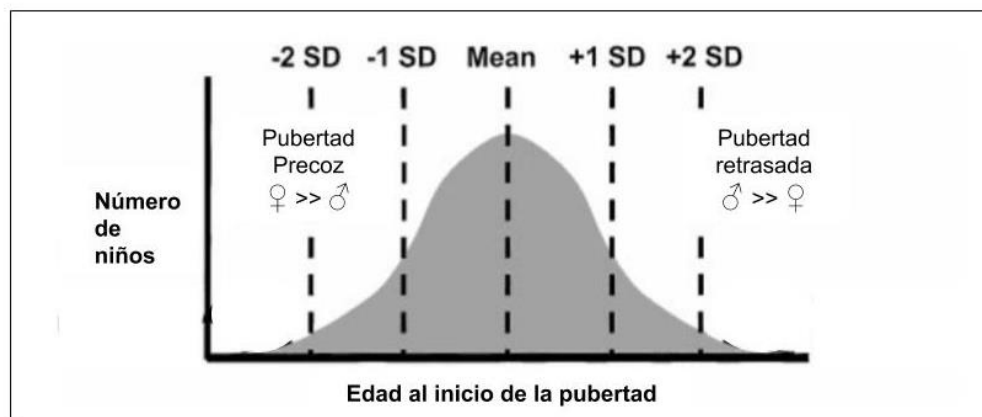


Figura 1. Distribución de la edad de inicio de la pubertad.



## 1.2 Neurorregulación

Desde una perspectiva neuroendocrinológica, la pubertad comienza cuando se incrementan la amplitud, el pico y el número de pulsos de secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por parte de neuronas hipotalámicas. Estos pulsos a su vez, estimulan a las células gonadotropas de la adenohipófisis en la producción de mayor cantidad de hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH) (5). La GnRH es una hormona polipeptídica, de 10 aminoácidos, codificada por el gen *GNRH1* (OMIM#152760; 8p21.2).

Las neuronas productoras de GnRH son únicas, puesto que se originan en la placoda olfatoria, ubicada fuera del sistema nervioso central (SNC). Migran hacia su posición final en el hipotálamo a partir de la sexta semana del periodo embrionario (6). En animales de experimentación como son los ratones, se ha podido documentar que esta migración parte de la placoda olfatoria medial, en la cavidad nasal en formación, atraviesa el septo nasal junto con los axones vomeronasales, entra en el prosencéfalo junto al *nervus terminalis* para finalmente alcanzar el área preóptica-septal e hipotálamo. No obstante, la ubicación final difiere según la especie (6,7). Cabe destacar que esta ruta migratoria constituye el vínculo existente entre pubertad y reproducción con el sentido del olfato (8).

Tras la transcripción del gen *GNRH1* en las neuronas hipotalámicas, se traduce en la proteína precursora de 92 aminoácidos. Los primeros 23 aminoácidos del extremo amino-terminal corresponden a la secuencia característica de las proteínas secretadas, este péptido señal es escindido dejando en el extremo amino-terminal una glutamina que sufre ciclación espontánea convirtiéndose en ácido piroglutámico. A partir de este aminoácido, se encuentran los 10 aminoácidos que conforman el decapeptido activo, seguido de una secuencia GKR, glicina-lisina-arginina, y los últimos 56 aminoácidos conocidos como péptido asociado a GnRH (GAP). La secuencia GKR es escindida por una endopeptidasa sobre los aminoácidos básicos (9). Así se produce el decapeptido activo cuya estructura terciaria será en forma de “C” con la convexidad mayor ocupada por la glicina en posición 6 (9). Tras ser procesada, es empaquetada en gránulos de secreción que serán transportados a través de los exones hacia la eminencia media para ser secretados a la circulación portal. Al inicio de la pubertad, se amplifica la producción de GnRH generando pulsos cada 60-120 minutos (10).

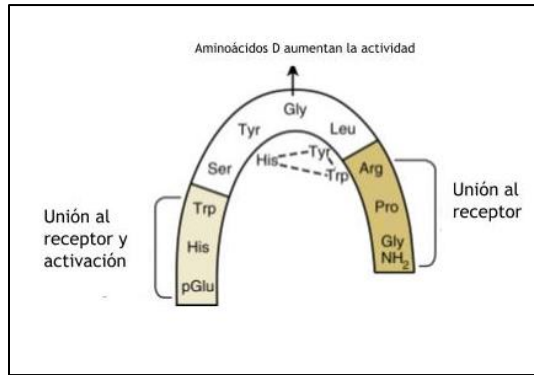


Figura 2. Representación de la molécula de GnRH tras las modificaciones post-traduccionales, adaptado de *Millar et al.* (9)

Al llegar a las células gonadotrópicas de la adenohipófisis que expresan el receptor de GnRH, codificado por el gen *GNRHR* (OMIM#138850; 4q13.2), la interacción de GnRH con su receptor activará la maquinaria celular encargada de la biosíntesis y secreción de las gonadotropinas: hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) (9,11). Estas dos hormonas se sintetizarán de manera pulsátil, y actuarán sobre ovarios y testículos estimulando su crecimiento y favoreciendo la producción de las hormonas esteroideas sexuales (testosterona, estradiol y sus metabolitos intermediarios) que, en definitiva, serán las responsables de la aparición de los cambios físicos de la pubertad (12,13).

Se estima que cada neurona de GnRH recibe miles de aferencias de otras neuronas. Por tanto, el incremento de la secreción de GnRH que marca el inicio puberal está sometido a un fino control de estímulos excitatorios e inhibitorios, tanto trans-sinápticos como gliales (5). Se especula que para el inicio de la pubertad se produciría un incremento de los estímulos excitatorios y una disminución de los inhibitorios. A continuación, se detallan estos estímulos:

### 1.2.1) Estímulos trans-sinápticos.

a) **Neuronas KNDy:** ubicadas en el núcleo infundibular (seres humanos y otros primates) o en el núcleo arcuato (roedores y otros mamíferos), expresan kisseptina1, neurokinina B y dinorfina (14-16).

- **Kisseptina1:** péptido producto de la degradación proteolítica de la prepro-kisseptina, proteína de 145 aminoácidos, codificada por el gen *KISS1* (OMIM# 603286; 1q32.1) que da lugar a los péptidos: kisseptina1-54 (metastina), que a su vez puede ser escindida en tres péptidos más cortos: kisseptina1-14,

kispeptina1-13 y kispeptina1-10. Los cuatro péptidos son biológicamente activos (15,16). Kispeptina1 es el mayor estímulo excitatorio de la producción de GnRH, ejerciendo su efecto mediante un receptor de membrana acoplado a proteína G conocido como KISS1R o GPR54 codificado por el gen *KISS1R* (OMIM# 604161; 19p13.3)(12,13,15). KISS1R se expresa en las neuronas productoras de GnRH y al ser estimuladas provocan un aumento en la transcripción y secreción de GnRH. Este hecho ha sido ampliamente demostrado tanto en modelos animales (murinos, y primates) como en humanos (14,15,17). La potencia de las diferentes kispeptinas no se afecta significativamente cuando el extremo amino-terminal varía, puesto que son los últimos 10 aminoácidos del extremo carboxi-terminal los que interaccionan y activan al receptor KISS1R. Éstos son residuos filogenéticamente muy conservados (18). Aunque kispeptina1 juega un papel fundamental en el proceso puberal, aún hoy se desconoce si desempeña un rol como factor desencadenante, permisivo o amplificador del estímulo de producción de GnRH (19). Las variantes de pérdida de función en el gen de kispeptina1 o en el de su receptor son causantes de hipogonadismo hipogonadotrofo permanente (20).

- Neurokinina B (NKB): es un péptido miembro de la familia de tachiquininas de los mamíferos, clasificadas como neurotransmisores. A esta familia pertenecen la sustancia P, neurokinina A, neuropéptido K, neuropéptido  $\gamma$  y hemokinina-1. NKB es una proteína co-expresada por las neuronas KNDy y codificada por el gen *TAC3* (OMIM# 162330; 12q13.3). El receptor de NKB se conoce como NKBR, es un receptor de membrana acoplado a proteína G (21), está codificado por el gen *TACR3* (OMIM# 162332; 4q24), y se expresa tanto en las neuronas productoras de GnRH como en las neuronas KNDy (17,19). NKB parece ejercer un efecto excitatorio sobre la producción de GnRH a través de dos mecanismos: a) estimulando directamente los receptores ubicados en la neurona productora de GnRH; b) un efecto autocrino al actuar sobre los receptores que están en la neurona KNDy, aumentando la producción de kispeptina1, que a su vez estimulará la producción de GnRH. Este último efecto se ha demostrado sólo durante el periodo puberal en un grupo de primates (17). Al igual que con el gen que codifica a kispeptina1, las variantes de pérdida de función en el gen que codifica a neurokinina B y su receptor causan hipogonadismo hipogonadotrofo permanente (22).

- Dinorfina: miembro de los opioides endógenos derivado del gen de la preproencefalina B *PDYN* (OMIM# 131340; 20p13). Los estudios realizados en modelos porcinos han revelado que este gen contiene los determinantes para la neoendorfina, dinorfina y leumorfina (23). Estos péptidos opioides, cada uno con una estructura leucina-encefalina, actúan sobre los receptores opioides kappa (23). Estos receptores no están presentes en la membrana de las neuronas productoras de GnRH por lo que el efecto inhibitorio que ejerce la dinorfina es a través de interneuronas. Las neuronas KNDy expresan el receptor opioide  $\kappa$ , de tal forma que la dinorfina ejerce un efecto autocrino sobre estas neuronas disminuyendo la producción de kisseptina1. *Nakahara et al* (24) plantean que, en la fase prepuberal, los efectos inhibidores, en particular el de la dinorfina, son preponderantes.

Las neuronas KNDy expresan receptor de estradiol  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), y se sabe que el estradiol (E) ejerce un efecto inhibitorio sobre éstas (2,14,16). Este mecanismo de retroalimentación negativa parece estar relacionado, al menos en el modelo murino, con un efecto directo del complejo ER $\alpha$ -E sobre la región promotora de *Kiss1* mediante la disminución de la acetilación H3 de las histonas a ese nivel. Esta disminución en la acetilación se ha relacionado con una menor expresión de *Kiss1*(25). Además, según los experimentos de *Tomikawa et al* (25) el complejo ER $\alpha$ -E podría favorecer la formación de un bucle de cromatina en la región 3' de *Kiss1* que también influiría en la inhibición de la expresión de kisseptina1.

**b) Neuronas que expresan kisseptina únicamente:** localizadas en la región preóptica rostral en seres humanos y primates o en el núcleo periventricular anteroventral (AVPV) en roedores y otros mamíferos (14-16). Estas neuronas hacen sinapsis excitatoria con las neuronas productoras de GnRH mediante kisseptina1. Expresan ER $\alpha$ , pero en esta población de neuronas el estradiol tiene un efecto estimulador de la producción de kisseptina1 (2,15,16). Este efecto también tiene que ver con la interacción del complejo ER $\alpha$ -E y el promotor de *Kiss1*, que en este caso va a promover un cambio de la forma inactiva a la forma activa, mediante la promoción de la acetilación de las histonas H3 a ese nivel, favoreciendo la transcripción (25). Estas neuronas han sido catalogadas como las responsables del pico de LH preovulatorio y no parecen estar implicadas en el inicio y mantenimiento de la pubertad (16,25). Este grupo de neuronas tiene otra

particularidad, y es que exhiben un dimorfismo sexual, a saber: sólo individuos del sexo femenino presentan esta respuesta. Esta diferencia podría ser debida a un desarrollo embrionario diferente en los circuitos del diencéfalo, motivado por una exposición a distintos esteroides gonadales durante el periodo neonatal (26). En el cerebro masculino, la exposición a la testosterona o sus metabolitos durante los primeros momentos de la vida postnatal altera de manera permanente los circuitos que se están formando en el diencéfalo, impidiendo que se genere el circuito necesario para la estimulación de la producción de GnRH/LH en respuesta al estradiol, en cambio el cerebro femenino al no estar expuesto a la testosterona sería capaz de crear estos circuitos (26).

- c) **Neuronas productoras de glutamato:** estímulo excitatorio sobre neuronas productoras de GnRH (12).
- d) **Estímulos inhibitorios trans-sinápticos:** recibidos desde las neuronas hipotalámicas productoras de opiáceos, péptido relacionado a la RF-amida (RFRP) y GABA (27). Las neuronas productoras de opiáceos en el hipotálamo inhiben la producción de manera directa (actuando sobre receptores de opiáceos tipo  $\mu$  en la membrana de las neuronas de GnRH) y de manera indirecta actuando sobre interneuronas (12,27,28).

### 1.2.2) Estímulos gliales

Estímulos excitatorios recibidos desde las células gliales mediados por dos mecanismos relacionados:

- Merced a la liberación de factores de crecimiento que actúan sobre receptores de las neuronas GnRH: factor de crecimiento transformador tipo B [TGFB], factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1.
- Interacciones de adhesión entre las células gliales y las neuronas GnRH (29).

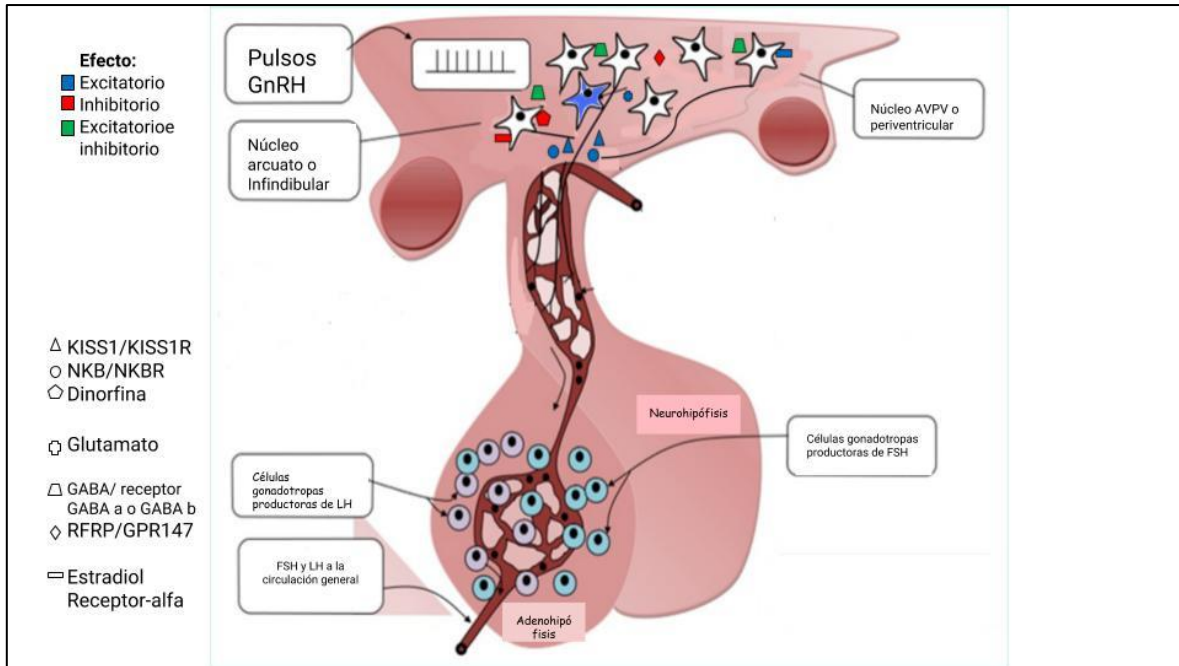


Figura 3. Representación del control del eje Hipotálamo-Hipófisis y de los estímulos que recibe la neurona productora de GnRH.

Tradicionalmente, se hablaba de dos teorías sobre el inicio y mantenimiento de la pubertad, merced a un predominio de estímulos inhibitorios o excitatorios, que a su vez, estarían regulados por factores genéticos y ambientales (2). Actualmente, se maneja la hipótesis de que las neuronas productoras de GnRH funcionan como el extremo efector de un sistema de múltiples capas jerárquicas reguladoras que integran las múltiples señales que influyen sobre el inicio puberal (19). El sistema biológico propuesto por *Ojeda et al* (5,12,29) ha identificado nodos jerárquicos de genes implicados en procesos de control de transcripción, como son: modificadores post-traduccionales de histonas, factores de transcripción, ARNs mensajeros no codificantes (ncARN), entre otros.

Un ejemplo de uno de estos sistemas es el compuesto por varios genes que previamente se habían relacionado con la formación/represión de tumores o TGR. Cada uno de estos genes es un nodo central o *hub* que controla a otro grupo de genes subordinado, los genes *hub* de este sistema son: *CDP/CUTL1/CUX1*, *MAF*, *p53*, *YY1* y *USF2*. Están firmemente conectados entre sí y también reciben señales de genes en un rango superior de control, en concreto *OCT2*, *TTF1* y *EAP1*. Estos últimos genes se han postulado como reguladores transcripcionales del proceso de la pubertad (2,12). En particular, se ha demostrado experimentalmente que el factor de transcripción tiroideo 1 o TTF1 interacciona, junto a otras proteínas, con el promotor del gen *KISS1* favoreciendo la transcripción. En cambio, el factor de transcripción conocido como

*Enhanced at Puberty 1* (EAP1) interacciona con el promotor del gen *KISS1* reprimiendo su transcripción (30).

Otro ejemplo lo constituye el sistema de represión post-transcripcional donde uno de sus nodos centrales es el gen *LIN28B* (OMIM# 611044; 6q16-q21) que codifica para una proteína de unión al ARN que inhibe la maduración de los micro ARN de la familia let7. Este gen fue conocido inicialmente gracias al desarrollo de estudios de asociación del genoma completo (GWAS) que trataban de relacionar ciertos *loci* con la edad de la menarquia (31). En esta línea de investigación, se ha demostrado en neuronas hipotalámicas de ratas puberales una disminución en la expresión de *LIN28B* y, a su vez, un incremento de la concentración de los microRNAs let7a y let7b (12).

Estos genes del centro de la red interactuarían entre ellos y, paralelamente, regularían la transcripción de genes subordinados, que a su vez controlarían una primera red de genes y así, sucesivamente (2). Parece ser que los mecanismos implicados en la regulación de estos sistemas de control podrían ser epigenéticos (12,32).

### 1.3 Control epigenético

En los últimos años se ha demostrado que los mecanismos epigenéticos juegan un papel fundamental dentro de los mecanismos reguladores del aumento de la producción de GnRH durante la pubertad (5). Las modificaciones epigenéticas, al ser sensibles a estímulos ambientales, ayudan a las células y sistemas en el proceso de adaptación al medio (33). Hasta la fecha se han descrito tres mecanismos de control epigenético:

- a) Metilación e hidroximetilación del ADN: la metilación/hidroximetilación de las citocinas de las islas CpGs en los promotores de los genes que influyen en la transcripción de éstos. Se ha constatado que la región promotora del gen que codifica para GnRH en ratas, primates y humanos existen islas CpG. Así pues, en células de primate se ha demostrado una disminución en la metilación de estas islas CpGs durante el periodo puberal (33).
- b) Las modificaciones post-traduccionales de las histonas: acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinización. En general, la acetilación está asociada a la activación de la transcripción mientras que la deacetilación con la inactivación de esta. La metilación de histonas tiene un efecto activador o inhibidor de la transcripción dependiendo del aminoácido que sea metilado. Por ejemplo, en la histona 3 la metilación

de la lisina en la posición 9 (H3K9me) y 27 (H3K27me) es una señal de inhibición de la transcripción, mientras que la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me) se relaciona con la activación de la transcripción (5). La fosforilación de las histonas tiene relación con la activación de la transcripción. Finalmente, la ubiquitinización, como la metilación, tiene diferentes efectos según el aminoácido ubiquitinizado. Así, se ha visto que la ubiquitinización de la lisina 119 de la histona 2A está asociada con disminución de la transcripción, pero la ubiquitinización de la lisina 120 de la histona 2B produce activación transcripcional (5,34). Estas modificaciones postraduccionales son las que utilizan las proteínas de la cromatina del grupo policombo (PcG) y del grupo tritorax (TrxG). Estos dos grupos de proteínas integran una combinación de acetil transferasas, desacetilasas y metil transferasas, que tienen efectos antagónicos. De esta forma, las PcG se caracterizan por efecto represor de la transcripción y las TrxG tienen un efecto facilitador de la transcripción. Estos dos grupos de proteínas ejercen su efecto cuando interaccionan con las histonas de las regiones reguladoras de los genes (5,32,33). En modelo murino y primates no humanos antes y durante la pubertad se ha demostrado que existe una disminución de la expresión de proteínas PcG y aumento de la expresión de proteínas TrxG en el hipotálamo, específicamente en los promotores de los genes *KISS1* y *TAC3* (5,32,33,35).

- c) ARN no codificante en forma de microARNs (miARNs) o ARN no codificante intergénico largo (lincARNs). En modelo murino, existen evidencias de que hay miRNAs activos en la red hipotalámica de GnRH, siendo miARN-200/429 y miARN155 claves en el complejo controlador del promotor de GnRH, entre otras cosas, inhibiendo la expresión de Zeb1 y Cebpb que fungen de inhibidores de la expresión de GnRH (19,36). Por otro lado, en modelo murino, se ha demostrado que durante la pubertad existe una disminución de la expresión hipotalámica de LIN28B que funciona como un bloqueante de la producción y maduración de los miARNs de la familia let-7, por lo que aumenta su concentración; y es este cambio en la relación de las concentraciones de LIN28 y los miARNs let-7 lo que se ha correlacionado con el inicio puberal, probablemente al funcionar estos últimos como inhibidores de factores, que a su vez, funcionarían como freno de la expresión de genes relacionados con el inicio puberal (19).



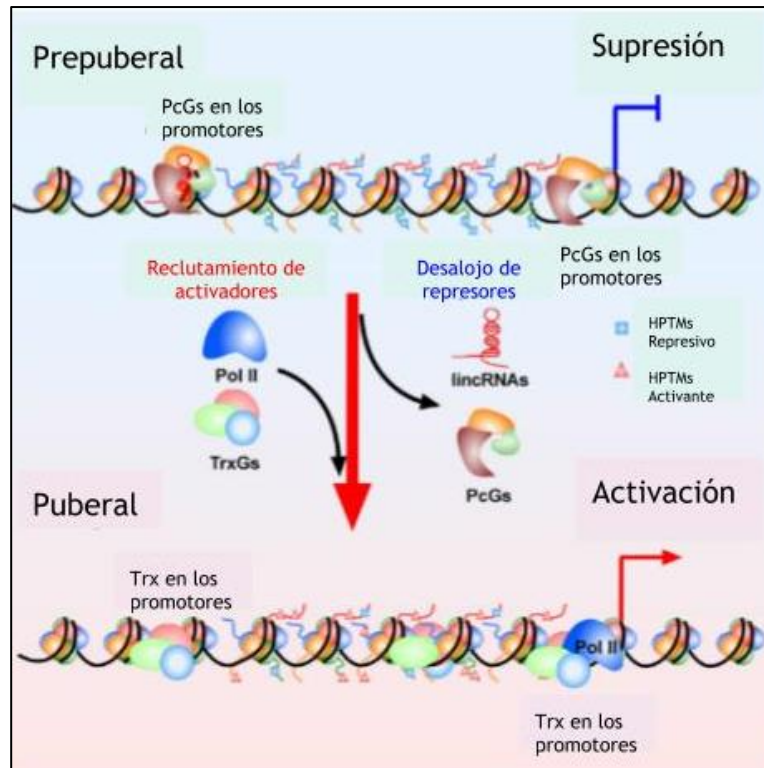


Figura 4. Esquema donde se plantea el control epigenético de los promotores de genes como *KISS1* y *TAC3*. Adaptado del trabajo de *Lomniczi et al* (12). PcGs: Proteínas del grupo policombo. Pol II: ARN polimerasa. TrxGs: Proteínas del grupo tritórax. lincRNAs: ARN no codificante largo. HPTMs: modificaciones postraduccionales de las histonas.

## 1.4 Control metabólico

El estado nutricional se encuentra íntimamente relacionado con el inicio y mantenimiento del proceso puberal. Clásicamente se ha descrito que para que se inicie la pubertad debe alcanzarse tanto un peso como un porcentaje de grasa corporal mínimo, sobre todo, en el sexo femenino (2,37-40).

El mecanismo de comunicación entre los sistemas de absorción y acumulación de energía, es decir, sistema digestivo y tejido adiposo, y el centro regulador del inicio puberal, el sistema nervioso central (SNC), en particular el hipotálamo, está compuesto por diversos péptidos cuyas características y funciones describimos a continuación:

- **Leptina:** es una hormona polipeptídica producida por el tejido adiposo, codificada por el gen *LEP* (OMIM:164160; 7q32.1). Sus valores sanguíneos son proporcionales al contenido de grasa corporal. Entre sus efectos destaca la estimulación de la saciedad y

el incremento del metabolismo basal estimulando un receptor de membrana de la familia de los receptores de citoquinas clase I codificado por el gen *LEPR* (OMIM:601007; 1p31.3)(23). Así, variantes de pérdida de función en el gen de leptina o de su receptor causan obesidad mórbida e hipogonadismo hipogonadotrofo (34). Las neuronas KDNy y las neuronas productoras de kipeptina1 del área preóptica expresan receptores de leptina. Hasta la fecha, no se ha podido constatar presencia de receptores de leptina en neuronas GnRH(39,40). Esta unión de leptina a su receptor modula positivamente la transcripción del gen *KISS1*(37,38,41,42).

- **Adiponectina:** es una adipoquina secretada por el adipocito implicada en la regulación del metabolismo favoreciendo la sensibilidad a la insulina, con efectos anti-inflamatorios y anti-aterogénicos (2,43,44). Es una hormona polipeptídica codificada por el gen *ADIPOQ* (OMIM: 605441; 3q27.3)(23). Las concentraciones de adiponectina en suero son inversamente proporcionales al grado de adiposidad en niños y adolescentes (37). Asimismo, presenta dimorfismo sexual: en el sexo femenino no hay cambios durante la pubertad mientras que en el sexo masculino parece disminuir a partir de la mitad del desarrollo puberal (Tanner III-IV). Estos hallazgos parecen relacionarse con el aumento de los niveles de andrógenos circulantes (37).

La adiponectina ejerce su efecto en el hipotálamo a través de su interacción con los receptores AdipoR1 o AdipoR2, receptores acoplados a proteína G, codificados por los genes *ADIPOR1* (OMIM: 607945; 1q32.1) y *ADIPOR2* (OMIM: 607946; 12p13.33). La interacción de adiponectina con el receptor tendría un efecto inhibitorio en la transcripción de kipeptina1 mediado por cascadas de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que afectarían a diferentes factores de transcripción (37,45). Por otra parte, parece que también ejerce alguna acción sobre la hipófisis, ya que se ha demostrado expresión de su receptor en células gonadotropas (37,45). En suma, parece que adiponectina tendría un papel inhibitorio sobre el inicio de la pubertad. No obstante, hasta la fecha, no se han relacionado alteraciones genéticas de la adiponectina o sus receptores con alteraciones en el inicio puberal.

- **Ghrelina:** es un péptido de 28 aminoácidos derivado de la pre-pro-ghrelina, codificado por el gen *GHRL* (OMIM#605353; 3p25.3) que interactúa con un receptor de membrana acoplado a proteína G, previamente conocido como receptor secretágo de la hormona de crecimiento tipo Ia. Dicho receptor está codificado por el gen *GHSR* (OMIM#601898;3q26.31) (37). Este péptido se sintetiza fundamentalmente en el sistema

digestivo, mayoritariamente por las células oxínticas de la mucosa gástrica, aunque también se produce en intestino, páncreas, hipotálamo e hipófisis (37,46). Para ejercer su efecto la ghrelina debe sufrir el cambio post-traducciona determinado por la acilación en la serina ubicada en la posición 3. Esta forma acilada puede cruzar la barrera hematoencefálica y es la forma que puede reconocer su receptor (37,46,47). La forma no acilada de la ghrelina es la forma más abundante en el plasma y, aunque inicialmente se la consideraba como una forma inactiva, actualmente se sabe que también es activa y tiene distintas acciones, algunas de ellas, superponibles a la forma acilada (37). Su papel principal es la regulación del apetito merced a un afecto anorexígeno sobre el SNC. De esta forma, sus concentraciones plasmáticas se encuentran disminuidas en estados de exceso de nutrición. Asimismo, parece ejercer un efecto inhibitorio sobre el desarrollo puberal, puesto que: a) hay una disminución progresiva de los valores sanguíneos de ghrelina a lo largo del desarrollo puberal (48); b) la infusión de ghrelina en ratas disminuye los niveles circulantes de gonadotropinas (principalmente de LH) y se objetiva un retraso en el desarrollo de diferentes ítems de la maduración puberal, este efecto es más marcado en las ratas de sexo masculino (47). En los humanos también se ha visto que la ghrelina tiene un efecto inhibitorio del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, de hecho, sus niveles en sangre disminuyen durante el proceso puberal, se cree que la ghrelina inhibe la producción de los pulsos de GnRH, pero aún no está claro el mecanismo por el cual realiza su efecto, puesto que las neuronas productoras de GnRH no expresan el receptor de ghrelina. Por tanto, se hipotetiza que, o bien su efecto es indirecto a través de las interneuronas o el efecto inhibitorio se ejerce independientemente del receptor de Ghrelina (37,49).

- **Sirtuina 1:** la sirtuina 1 (SIRT1) es homóloga al factor de envejecimiento conocido como regulador silente de la información 2 descrito en *Saccharomyces cerevisiae* (35). SIRT1 es una deacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup>, actúa sobre las histonas y otras dianas celulares para regular varios procesos biológicos incluyendo los mecanismos de control circadiano. Las sirtuinas actúan como un sensor de la energía celular al estar ligadas a la disponibilidad del cofactor NAD<sup>+</sup>, por lo que las situaciones como la restricción calórica que aumentan la relación NAD<sup>+</sup>/NADH o NAD<sup>+</sup>/nicotinamida, producen activación de SIRT1. Se ha demostrado que SIRT1 se expresa en el hipotálamo y suprime la transcripción de *Kiss1* en ratas actuando junto a las proteínas PcG. Al inicio de la pubertad SIRT1 es desplazada del promotor de *Kiss1* facilitando el cambio configuracional de la cromatina de represora a activadora de la transcripción (35).

Además, se ha constatado que estos cambios se observan de manera acelerada en ratas con obesidad y se retrasa en ratas con desnutrición. En suma, SIRT1 es otra molécula capaz de relacionar la información nutricional/ambiental con la reproducción.

- **DLK1:** es una proteína transmembrana parecida al factor de crecimiento epidérmico que está implicada en la adipogénesis como factor inhibidor de la diferenciación de las células mesenquimales a adipocitos, y también regula la diferenciación de las células  $\beta$  del páncreas (50). Su expresión en la vida embrionaria es ubicua, pero en la vida postnatal se expresa en ovarios, glándulas suprarrenales, varios núcleos hipotalámicos y en neuronas productoras de kipeptina1, por lo que se supone que tiene funciones neuroendocrinas (50,51). Está codificado por el gen *DLK1* (OMIM#176290;14q32.2) sometido a impronta materna, es decir, sólo se expresa el alelo paterno. Aunque todavía no se ha demostrado la relación que tiene con el inicio puberal, se ha constatado que el fallo de su expresión está relacionado con el adelanto patológico de la pubertad, la obesidad central y la diabetes tipo 2 (50,51).

## 1.5 Cambios físicos

Una vez activado el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, fenómeno conocido como gonadarquia, los esteroides sexuales comenzarán a actuar en los tejidos diana (52). En las niñas, el 17- $\beta$ -estradiol actuará sobre las células glandulares mamarias estimulando su crecimiento y proliferación. Este crecimiento es también a expensas de la proliferación de las células de tejido adiposo (37). De esta forma, visualizaremos telarquia progresiva a lo largo del desarrollo puberal. Este proceso se clasifica en cinco estadios, que van desde el prepuberal (S1) hasta el adulto (S5). El estadio puberal de Tanner II que corresponde a un desarrollo mamario S2 indica el inicio de la pubertad. (4). El tiempo medio transcurrido entre la aparición de telarquia progresiva y aparición de la menarquia suele ser de dos años (2).

En los niños, la FSH actuará sobre las células de Sertoli, productoras de inhibina B, y la LH sobre las células de Leydig, productoras de testosterona. Gracias a la acción sinérgica de las gonadotropinas sobre estas células testiculares, se producirá un incremento del tamaño testicular. Cuando el tamaño testicular es superior a 4 ml según orquidómetro de Prader es indicativo del inicio de la pubertad. A su vez, la testosterona y su metabolito activo dihidrotestosterona (DHT) favorecerán el desarrollo de caracteres sexuales masculinos que también se categorizan mediante los estadios puberales de Tanner. En este caso se valora por

un lado crecimiento del pene y grado de pubarquia y, por otro, el tamaño testicular mediante el orquidómetro de Prader (3).

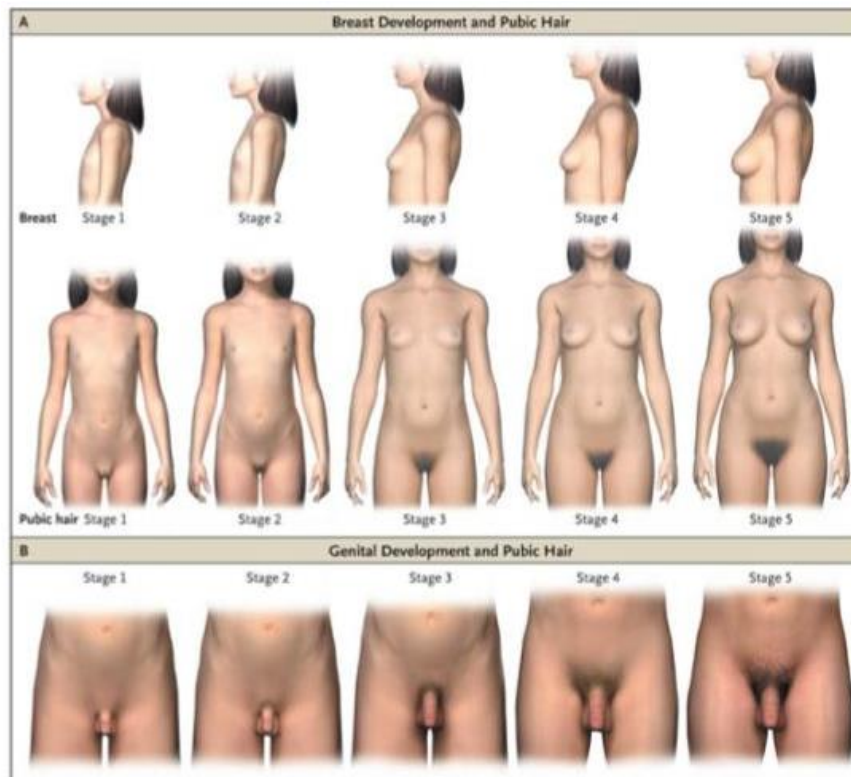


Figura 5. Estadios puberales según Tanner(3,4). Imagen adaptada de *Carel et al* (53).

En niños y niñas, la acción sinérgica entre esteroides sexuales y la hormona de crecimiento se traducirá en un incremento de la velocidad de crecimiento durante el desarrollo puberal (10). Así, el pico máximo de crecimiento observado durante la pubertad es algo más temprano en las niñas, entre el estadio puberal Tanner II y III, precediendo a la menarquia. En los niños, esta aceleración de crecimiento se objetiva en el estadio puberal Tanner IV. Desde el comienzo de Tanner II hasta alcanzar la talla adulta, las niñas crecen entre unos 20 y 25 cm de media mientras que los niños, aproximadamente, entre 25 y 30 cm. El crecimiento después de tener la menarquia oscila entre 6 y 8 cm, pudiéndose incrementar si la aparición de la primera menstruación ha sido más temprana (1,2).

Es importante distinguir la gonadarquia de la adrenarquia. La gonadarquia, como se comentó anteriormente se refiere a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y es responsable de la acción de las gonadotropinas sobre ovarios y testículos y, por lo tanto, de la producción de estradiol y testosterona por las gónadas. Mientras que la adrenarquia se refiere al aumento de secreción de andrógenos adrenales, sobre todo dehidroepiandrosterona

sulfato (DHEA-S) que es responsable de la producción de la pubarquia, axilarquia y cambio del vello corporal con patrón androide y ginecoide y estimulación de las glándulas apocrinas. En suma, la adrenarquia es responsable de la pubarquia y el estímulo de las glándulas apocrinas (1,2,52).

En resumen, la telarquia progresiva es la primera manifestación del desarrollo puberal en niñas frente al incremento del tamaño testicular observado en los niños. (1,11,54).

### 1.6 Tendencia secular de la edad de inicio de la pubertad

En los últimos 150 años se ha constatado un adelanto en el inicio de la pubertad en el sexo femenino. A mediados del siglo XIX la edad de la menarquia estaba alrededor de los 17 años y a mediados del siglo XX se situaba alrededor de los 13 años (54,55). Este fenómeno ha sido relacionado con la mejoría en las condiciones de vida de niños y adolescentes, fundamentalmente en lo referente a aspectos nutricionales. No obstante, este adelanto de la edad de aparición de la pubertad parece haberse atenuado en las dos últimas décadas del siglo XX. De esta forma, se ha descrito un adelanto leve, pero estadísticamente significativo de 2,5-4 meses (2,54,55).

A finales de 1990 un estudio epidemiológico estadounidense alarmó a la comunidad científica internacional porque objetivó un claro adelanto de la aparición de telarquia, particularmente en niñas de etnia afroamericana. En cambio, no se constató un adelanto similar de la menarquia (56). Este estudio generó muchas críticas. De todas ellas, la más relevante fue estimar el estadio puberal a través de la evaluación del grado de telarquia por inspección y no por palpación (2,55). Más adelante, un estudio epidemiológico danés ha mostrado un adelanto en la aparición de la telarquia que no se ha acompañado de disminución en la edad de aparición de la menarquia (2,54,55).

A diferencia de lo que ocurre con las niñas, disponemos de muy pocos datos sobre la evolución del desarrollo puberal en niños que nos permitan extraer conclusiones (2,54,55).

En suma, en el momento actual, se mantienen los mismos criterios utilizados para definir pubertad normal que a finales del siglo XX.

## 2.- Pubertad patológica

### 2.1. Pubertad precoz

Se define como la aparición de telarquia progresiva antes de los 8 años en las niñas y aumento del volumen testicular ( $\geq 4$  ml) antes de los 9 años en los niños, acompañado de aceleración de la velocidad de crecimiento y adelanto de la edad ósea (53,57,58). Según el mecanismo de producción se clasifica en:

- ✓ Pubertad precoz central (PPC) o gonadotropin-dependiente: existe una activación precoz del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (53,57,59).
- ✓ Pubertad precoz periférica (PPP) o gonadotropin-independiente: producida por aumento de esteroides sexuales sin objetivar elevación de gonadotropinas (58).
- ✓ Pacientes con pubertad precoz mixta (PPM): son niños o niñas con una PPP de largo tiempo de evolución que al recibir terapia frenan bruscamente la retroalimentación negativa de los esteroides sexuales y, de esta forma, se activa el eje gonadotropo (58).

En este trabajo nos centraremos en la PPC. Ver tabla 1.

#### 2.1.1 Epidemiología PPC

Es una entidad rara, pero con incremento notable de casos desde el comienzo de siglo XXI. Ocurre con más frecuencia en niñas que en niños con una relación 10-20:1(52,59). La incidencia calculada para el período 1997-2009 por el registro español de pubertad precoz central PUBERE(60) fue de 0,02-1,07 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, si lo separamos por sexo: niños 0-0,23; niñas 0,13-2,17 por cada 100.000 habitantes (60).

Es relevante señalar que es una entidad observada con mayor frecuencia en niñas adoptadas. Aunque no está claro cuál es la relación entre la PPC y la adopción se cree que los factores nutricionales, raciales, emocionales y ambientales pueden estar implicados (52,57,59,60).



## 2.1.2 Clasificación etiopatogénica de la PPC

En la tabla 1 se recoge la clasificación de la pubertad precoz y sus causas.

Pubertad Precoz Central	Pubertad Precoz Periférica
<b>1.- Lesiones del Sistema Nervioso Central</b> <b>1.1.- Congénitas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Hamartoma hipotalámico.</li> <li>✓ Quiste aracnoideo.</li> <li>✓ Hidrocefalia.</li> <li>✓ Displasia septo-óptica.</li> <li>✓ Malformación tipo Chiari.</li> <li>✓ Mielomeningocele.</li> </ul> <b>1.2.- Adquiridas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Tumores: gliomas de bajo grado, ependimoma, pinealoma, craneofaringioma, germinoma.</li> <li>✓ Irradiación del SNC.</li> <li>✓ Traumatismo craneoencefálico.</li> <li>✓ Infecciones del SNC.</li> <li>✓ Enfermedad granulomatosa.</li> <li>✓ Sangrado intracraneal.</li> <li>✓ Parálisis cerebral secundaria a encefalopatía hipóxico-isquémica.</li> </ul> <b>2.- Sin lesiones del Sistema Nervioso Central</b> <b>2.1.- Idiopática</b> <b>2.2.- Genética</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mutaciones activantes <i>KISS1R</i>.</li> <li>✓ Mutaciones activantes <i>KISS1</i>.</li> <li>✓ Mutaciones inactivantes <i>MKRN3</i>.</li> <li>✓ Mutaciones inactivantes <i>DLK1</i>.</li> <li>✓ Alteraciones cromosómicas estructurales.</li> </ul> <b>2.3.- Ambiental</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Adopción internacional.</li> <li>✓ Disruptores endocrinos.</li> </ul>	<b>1.- Niños</b> <b>1.1.- Congénitas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mutación gen <i>LHR</i> (<i>testotoxicosis</i>).</li> <li>✓ Hiperplasia suprarrenal congénita.</li> <li>✓ Hipoplasia suprarrenal congénita por mutación gen <i>DAX1</i>.</li> </ul> <b>1.2.- Adquiridas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Tumor testicular.</li> <li>✓ Tumor suprarrenal.</li> <li>✓ Tumores productores de <math>\beta</math>-HCG: mediastino, hígado, cerebro.</li> </ul> <b>2.- Niñas</b> <b>2.1.- Congénitas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Síndrome de McCune-Albright</li> </ul> <b>2.2.- Adquiridas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Quiste ovárico</li> <li>✓ Tumor ovárico.</li> </ul> <b>2.3.- Niños y niñas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Esteroides sexuales exógenos.</li> <li>✓ Hipotiroidismo primario grave.</li> </ul>
<b>Pubertad Precoz Mixta</b> Comienzo como PPP con activación central de la pubertad secundariamente.	

Tabla 1. Clasificación de la pubertad precoz según la etiopatogenia, adaptado de Soriano *et al* (52).



A continuación, detallamos las causas de PPC.

### *2.1.2.1 Secundaria a alteraciones del SNC*

Claramente más prevalente en niños que en niñas. La mitad o más de los casos de PPC en niños son secundarios a lesiones del SNC. Sin embargo, en niñas sólo alrededor del 10% de los casos son secundarios a lesiones del SNC (1,52,57).

La lesión cerebral más frecuentemente relacionada a la PPC es el hamartoma hipotalámico, y aunque el mecanismo de producción no está del todo claro, se piensa que su efecto puede ser secundario a la presión mecánica que ejerce sobre las neuronas productoras de GnRH o por constituir en sí mismo un generador de pulso de GnRH ectópico (52).

### *2.1.2.2 Causas genéticas*

En 2004, *De Vries et al* (61) objetivaron que hasta el 27,5% de los casos de PPCI tenían un antecedente familiar que concordaba con un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta (52,61,62). Exponemos a continuación las alteraciones genéticas descritas en la literatura hasta la fecha.

#### Receptor de kisseptina1, gen: *KISS1R* (OMIM# 604161; 19p13.3)

En 2008 se describió por primera vez un defecto genético causante de PPC(63). En ese trabajo, *Teles et al*, describieron el caso de una niña adoptada con diagnóstico de PPCI en la que se encontró la variante NM\_032551: c.1157G>C; NP\_115940: p.Arg386Pro en heterocigosis en *KISS1R*. Realizaron un estudio funcional en el que evaluaron la expresión del receptor de kisseptina1 en dos grupos de células COS-7, un grupo transfecto con el receptor nativo, otro grupo con el receptor portador de la variante p.Arg386Pro. A continuación, estimularon a las células con concentraciones crecientes de kisseptina1 y midieron las concentraciones intracelulares de inositol-fosfato, que es la molécula producida como segundo mensajero tras la estimulación del receptor de kisseptina1. De esta forma, demostraron que las células portadoras del receptor mutado presentaban un aumento de la concentración de inositol-fosfato de forma más prolongada en el tiempo que las células con el receptor nativo. Así pues, concluyeron que este efecto podría explicar la PPC presente en la paciente (63).

A partir de ese momento se comenzó a buscar variantes de ganancia de función en este receptor en pacientes con diagnóstico de PPC, pero hasta la fecha, en nuestro conocimiento, no se han descrito nuevos casos (62,64,65). En cambio, las variantes de pérdida de función en *KISS1R* sí se han relacionado con el hipogonadismo hipogonadotrofo permanente (58).

[Kispeptina1, gen \*KISS1\* OMIM# 603286; 1q32.1](#)

En 2010, *Silveira et al* (66), describieron tres pacientes con PPC con mutaciones en el gen *KISS1*. Un paciente masculino con PPC que tenía la variante NM\_002256.3: c.369C>T; p.Pro74Ser en heterocigosis, variante que cambia la citosina en posición 369 por una timina, ocasionando el cambio de una prolina a una serina en la posición 74 de la proteína. Además, describieron dos niñas no emparentadas, con diagnóstico de PPCI en las que se encontró la variante NM\_002256.3:c.268C>G;p.His90Asp en homocigosis en el gen *KISS1*. Esta variante cambia la citosina ubicada en la posición 417 por una guanina, produciendo el cambio de una histidina a un ácido aspártico en la posición 90 de la proteína. Ambos cambios estaban ausentes en una muestra de 200 individuos con pubertad normal. No obstante, la variante p.His90Asp se había descrito en población control Europea con una baja frecuencia (66).

Con el propósito de evaluar el efecto de estas variantes realizaron el siguiente estudio funcional: sintetizaron químicamente los polipéptidos kispeptina1 nativo, kispeptina1 portador de la variante p.Pro74Ser y kispeptina1 portador de la variante p.His90Asp. A una línea celular de ovario de hámster chino que expresaba de manera estable el receptor de kispeptina1 (CHO-KISS1R) se le añadió las tres kispeptinas1 sintetizadas y se midió la concentración de inositol-fosfato como respuesta al estímulo sin observar diferencias significativas en la concentración ni en el tiempo de respuesta para los tres grupos. Después, realizaron el mismo experimento, pero pre-incubando las células durante dos horas con suero humano al 50%. Estos autores evidenciaron un desplazamiento de la curva dosis/respuesta hacia la derecha que sugería una disminución de la potencia de acción de la kispeptina1. Aunque en los tres grupos hubo un desplazamiento de la curva hacia la derecha, el grupo estimulado con la kispeptina1 portadora del cambio p.Pro74Ser mostró un desplazamiento significativamente menor. Este hecho permitió concluir a los investigadores que este cambio podría disminuir la tasa de degradación de kispeptina1 y por lo tanto aumentar su efecto. El cambio estaba presente en el niño afecto y en su madre y abuela materna, quienes no habían presentado adelanto puberal. La conclusión de este estudio fue que la variante p.Pro74Ser era probablemente patogénica con

una penetrancia incompleta y que la variante p.His90Asp era de significado clínico incierto, puesto que no se pudo demostrar ningún efecto en el estudio funcional(66).

Así como con *KISS1R*, en nuestro conocimiento no se han descrito nuevos casos de PPC secundarios a variantes de ganancia de función en *KISS1* (62,65,67-69).

En 2012 *Huijbregts et al* (70) reportaron polimorfismos en la región 3'UTR que afectan a una región rica en guaninas. Este tipo de regiones son abundantes en el genoma, sobre todo en regiones reguladoras como promotores, potenciadores o regiones no traducidas del ARNm. Las regiones con bloques de guaninas sucesivas pueden ser reconocidas por proteínas fijadoras de ADN o ARN y también tienen la capacidad de formar estructuras cuadriláteras de guaninas *in vitro* (71). En este sentido, se piensa que puedan tener un papel relevante en la regulación de la transcripción y traducción(71). No obstante, se desconoce su posible efecto sobre la expresión de *KISS1*.

### [MKRN3 \(OMIM# 603856; 15q11.2\)](#)

Este gen codifica para la proteína *makorin ring finger 3* (MKRN3). Esta proteína está implicada en el proceso de ubiquitinización, proceso mediante el cual se agrega una o varias moléculas de ubiquitina a las proteínas. La ubiquitinización de las proteínas sirve para facilitar la proteólisis mediada por el proteosoma, modular la función de la proteína y/o para dirigir a la proteína a su localización final (72,73). En la figura 6 se muestra un esquema de este proceso.

MKRN3 es una E3 ligasa, es decir, es la proteína que transfiere la ubiquitina del complejo E2:ubiquitina a la proteína sustrato (72,74). La proteína MKRN3 incluye tres dominios dedo de zinc tipo C3H1 y un dominio dedo de zinc tipo C3HC4 RING, (ver figura 7)(75,76). El dominio C3H1 está relacionado con la unión a ARN, mientras que el dominio C3HC4 RING está asociado a la actividad ubiquitin ligasa (74,76,77).

El gen *MKRN3* es un gen sin intrones sometido a impronta materna, es decir, sólo se expresa el alelo paterno. Está localizado en el cromosoma 15, coordenadas genómicas: 23565678-23630075. Las alteraciones en el alelo paterno de esta región (15q11-q13) ocasionan el síndrome de Prader-Willi (PWS)(78). Sin embargo, *Kanberet et al* (79) analizaron el genotipo de una serie de pacientes con PWS y concluyeron que los genes *MKRN3*, *MAGEL2* o *NDN* no estarían implicados en la etiopatogenia de PWS.

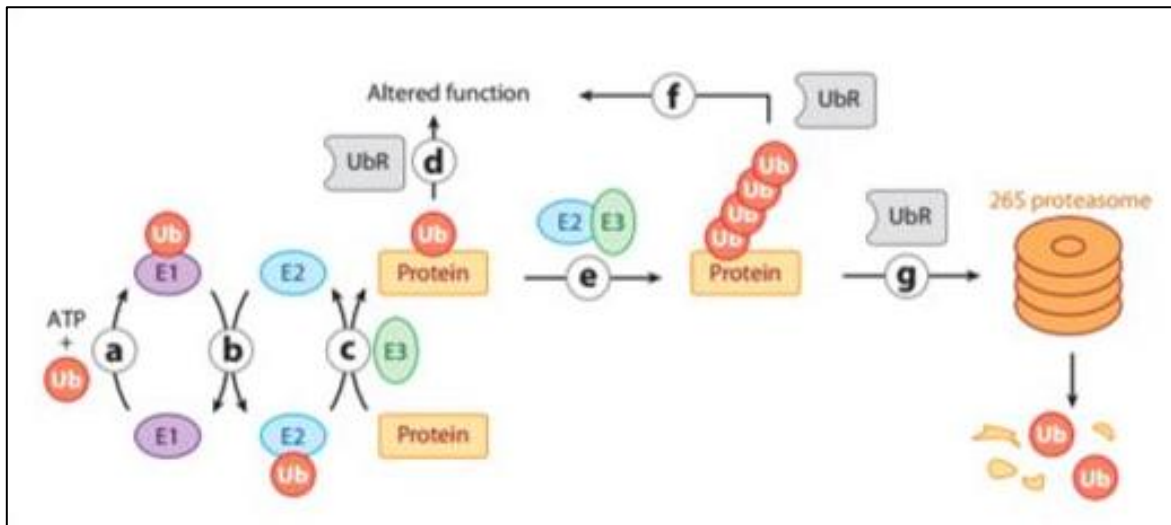


Figura 6. Representación del proceso de ubiquitinización. Adaptado de *Deshaies y Joazeiro* (74). (a) Ubiquitina (Ub) es activada con una molécula de ATP por la enzima activadora de la Ub (E1). (b) la Ub activada es transferida desde el sitio activo de E1 a la cisteína del sitio activo de la enzima conjugadora de Ub (E2). (c) El complejo E2~Ub interacciona con la ubiquitin ligasa E3 (E3), que es la que transfiere la molécula de Ub a la un residuo de lisina en la proteína sustrato. La proteína monoubiquitinada puede disociarse de E3 o (d) adquirir otra/s molécula/s de Ub (e). La molécula Ub o la cadena de Ub puede alterar la función al cambiar la estructura (f) o puede dar la señal al proteosoma para la degradación de la proteína ubiquitinada.

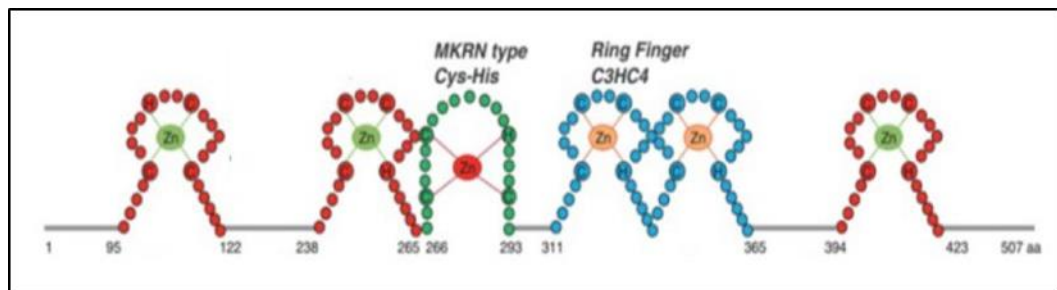


Figura 7. Representación de la proteína MKRN3 donde se muestran los dominios funcionales. En rojo dedo de zinc tipo C3H1, en verde el dedo de zinc Cys-His y en azul el dedo de zinc tipo C3HC4 RING. Adaptado de *Abreu et al* (76).

En modelos murinos y de primates se ha demostrado que la proteína MKRN3 tiene una expresión preferencial en el hipotálamo infantil y que su expresión disminuye conforme avanza la pubertad (80). Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual ésta afecta la producción

de GnRH, se cree que forma parte de las señales inhibitorias de su producción. En una revisión reciente *Aylwin et al* (81) postulan que *MKRN3* participaría como un regulador de la transcripción al realizar modificaciones post-traduccionales, por su actividad ubiquitin ligasa, catalogándola como un escritor epigenético. Estos mismos autores hablan de que *MKRN3* reprime la transcripción de *Kiss1* y *Tac3*, aunque los experimentos que avalan esta hipótesis no han sido publicados para el momento en el que fue escrito este trabajo (81).

En 2013, *Abreu et al*, (72) identificaron en cinco familias de un total de 15 estudiadas, cuatro variantes patogénicas en el gen *MKRN3* que segregaban con la enfermedad. Tres de las variantes patogénicas eran variantes que ocasionaban cambio de patrón de lectura y aparición de un codón de parada prematuro. La cuarta era una variante de cambio de sentido catalogada como poco tolerada por los predictores *in silico*. Los investigadores concluyeron que las variantes de pérdida de función en este gen causaban PPC. Posteriormente, se han descrito numerosos pacientes con PPC secundarias a variantes patogénicas en la región codificante de *MKRN3* (62,72,77,78,82-94). Además, también se ha descrito como patogénica la delección de 4 nucleótidos y una variante de cambio de sentido en la región promotora de *MKRN3* (93,95).

La mayoría de las variantes de cambio de sentido descritas como patogénicas están localizadas en los dominios C3HC4 RING o en los dominios C3H1, el resto de las variantes descritas, en su mayoría son cambios sin sentido o variantes que cambian el patrón de lectura y ocasionan la aparición de un codón de parada prematuro que ocasionaría una proteína truncada (62). En la tabla 2 se muestra un resumen de las variantes patogénicas en *MKRN3* que han sido publicadas hasta abril 2019.

Actualmente, se considera que las variantes patogénicas en este gen son responsables del 30-40% de los casos familiares de PPC y de aproximadamente el 5% de los casos esporádicos de PPC (13,19,52,57).

## INTRODUCCIÓN

Variante c. HGVS	Variante p. HGVS	Tipo	Familias	Edad de presentación niñas (media si >1 paciente)*	N	Edad de presentación niños (media si >1 paciente)	N	Origen.	Autor año de publicación
c.-150_-147del TCAG	-	reg	1	7				Brasil	Macedo 2018 (93)
c.-81C>T		reg	1			1	1	China	Lu 2018 (94)
c.-89C>T	p.Pro30Leu	ms	1	5	1			Europeo	Simon 2016 (83)
c.-203G>A	p.Arg68His	ms	1	7,75	1			Ecuador	Ortiz-Cabrera 2017 (62)
c.-331G>T	p.Glu111*	ns	1	6,1	1	9	1	Alemania	Schreiner 2014 (77)
c.-482dupC	p.Ala162Glyfs*15	ins	11	6,01	14	7,8	3	Europeo y USA	Abreu 2013 (72), Schreiner 2014 (77), Simon 2016 (83)
c.-482delC	p.Pro161Argfs*10	del	2	6,4	2			Brasil	Macedo 2014 (92)
c.-478_485del	p.Pro160Cysfs*14	del	2	6,25	3		1	Italia	Grandone 2015 (84) Grandone 2017 (90)
c.-630_650delins GCTGGGC	p.P211Lfs*16	delins	1	-		1	1	Turquia	Aycan 2018 (89)
c.-675dupA	p.Gln226Thrfs*6	ins	1	4	1			Brasil	Macedo 2014 (92)
c.-683_684insA	p.Glu229fsArg*3	ins	1	5	1	5		Japón	Nishioka 2017 (91)
c.-767delA	p.Glu256Glyfs*36	del	1	6	1			Brasil	Macedo 2014 (92)
c.-802-803del	p.Met268Valfs*23	del	1	3,5	1			European	Simon 2016 (83)
c.-841C>T	p.Gly281*	ns	1	6,7	1	desconocido	2	Korea	Lee 2014 (82)
c.-892G>T	p.Glu298*	ns	1	5,7	4**			Chipre	Christoforidis 2017 (94)
c.-935G>A	p.Gly312Asp	ms	1	5,85	2			Grecia	Neocleous 2015 (86)
c.-943A>G	p.Met315Val	ms	1	5,75	2			Europeo	Simon 2016(83)
c.-982C>T	p.Arg328Cys	ms	2	6	3			Europeo	Simon 2016 (83) Grandone 2017 (90)
c.-1018T>G	p.Cys340Gly	ms	1	7,1	1	9,2	1	Grecia	Settas 2014 (87)
c.-1034G>A	p.Arg345His	ms	1	6	1	desconocido	1	Dinamarca	Känsäkoski 2015 (85)
c.-1095G>T	p.Arg365Ser	ms	1	5,95	2	9,7	1	Bélgica	Abreu 2013(72)
c.-1118C>T	p.Pro373Leu	ms	1	4,65	2			Europea	Simon 2016(82)
c.-1172dupA	p.Tyr391*	ins	1	5,95	2		1	Brasil	Abreu 2013 (72), Grandone 2017 (90)
c.-1229G>A	p.Cys410Ter	ns	1	6	1			Europea	Grandone 2017 (90)
c.-1249T>A	p.Phe417Ile	ms	1	6	1			Brasil	Macedo 2014 (92)
c.-1260T>G	p.His420Gln	ms	1	5,17	3	9,8*	1	Judío Ashknazi-Sefardi	De Vries 2014 (88)

Tabla 2. Resumen de las variantes patogénicas en el gen *MKRN3* publicadas hasta abril 2019. del: delección; ins: inserción; ns: sin sentido; ms: cambio de sentido. \* Edad al diagnóstico cuando no se conocía la edad de aparición. \*\* Familia con 4 hermanas todas portadoras de la variante y una de las hermanas con telarquia a los 8,5 años (no criterios de PPCI)

### [DLK1 \(OMIM#176290;14q32.2\)](#)

El primer indicio de la relación entre la PPC y el gen *DLK1* fue la descripción del síndrome de Temple. Éste se caracteriza fundamentalmente por presentar retraso del crecimiento intrauterino (RCIU), manos y pies pequeños, PPC, obesidad, y hasta en el 30% de los casos discapacidad intelectual leve (50,51,96,97). Este síndrome es debido a disomía uniparental (DUP) materna del cromosoma 14 o deleciones o duplicaciones del cromosoma 14, citobanda 14q32.2 de origen paterno (50,96,97).

El gen *DLK1*, ubicado en la región relacionada con el síndrome de Temple, se encuentra sometido al fenómeno de impronta materna, por lo que sólo se expresa el alelo de origen paterno, y se ha relacionado con la etiopatogenia de la PPC presente en el síndrome de Temple (96).

En 2017, *Dauber et al*, estudiaron una familia con varios miembros afectados de PPC y encontraron un reordenamiento complejo en el gen *DLK1* que incluía la deleción del primer exón y la inserción de un segmento del intrón 3 que segregaba con la enfermedad siguiendo un patrón autosómico dominante con impronta materna (51).

En 2018, *Gomes et al* (50) estudiaron el gen *DLK1* en mujeres con antecedente de menarquia prematura o con diagnóstico de PPC, encontrando en cinco pacientes, provenientes de tres familias distintas, tres variantes de pérdida de función que segregaban con la enfermedad. En este grupo de pacientes eran más prevalentes las siguientes alteraciones metabólicas: sobrepeso/obesidad, alteraciones del metabolismo hidrocarbonado y dislipemia. Como consecuencia, conociendo el efecto anti-adipogénico de DLK-1, los investigadores postularon que esa molécula podría ser relevante en la interacción entre metabolismo y reproducción.

### [Alteraciones cromosómicas](#)

Algunas alteraciones cromosómicas, responsables de fenotipos sindrómicos pueden incluir adelanto puberal, por ejemplo: la microdeleción 1p36, la microdeleción 7q11.23 (síndrome de William-Beuren), deleción 9p, la disomía uniparental materna del cromosoma 7 (síndrome de Silver-Russell), la inversión-duplicación del cromosoma 15, la deleción del gen *CDKL5* que ocasiona un fenotipo similar al síndrome de Rett, con adelanto puberal(57).

### *2.1.2.3 Pubertad precoz central idiopática (PPCI)*

Con este término se denominan los casos de PPC en los que no es posible encontrar ninguna causa reconocible. Más frecuentes entre las niñas. Con el descubrimiento de los genes anteriormente citados causantes de PPC, los casos idiopáticos están disminuyendo. (52,57,98).

### **2.1.3 Diagnóstico**

#### *2.1.3.1 Anamnesis y examen físico:*

En la evaluación de un niño o niña con sospecha de pubertad precoz resultará de suma importancia la realización de una anamnesis exhaustiva y un examen físico dirigido. Con posterioridad, deberá individualizarse la realización de pruebas complementarias (1,52,57,60).

#### *2.1.3.2 Pruebas hormonales*

La prueba de hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) continúa siendo la “prueba de oro” para el diagnóstico de PPC. El objetivo de esta prueba es evaluar la respuesta hipofisiaria a la estimulación con un análogo de GnRH. Consiste en la medición basal de LH y FSH tras la administración de 100 µg vía intravenosa de LHRH (análogo de GnRH) a intervalos de 15-30 minutos durante 90 minutos. Para el diagnóstico de PPC se han propuesto puntos de corte LH que se sitúan entre las 5 y 8 UI/l en pacientes mayores de 2 años y en 10 UI/l en menores de 2 años (52,57,59).

Las nuevas técnicas de medición de LH y FSH utilizan ensayos inmunofluorométricos (IFMA), inmunoquimioluminiscentes (ICMA) o electroquimioluminométricos (ECLIA). Ello ha permitido mejorar la sensibilidad y especificidad garantizando límites de detección del orden de 0,1 UI/l. Por ello, se ha intentado extender el uso de la LH basal para el diagnóstico de los pacientes con PPC. No obstante, su utilidad se ha demostrado muy limitada puesto que en los pacientes en estadios precoces del desarrollo puberal (Tanner II) los valores basales de LH se solapan con los valores prepuberales (52,57-59).

Los valores de 17-β-estradiol tienen poca utilidad en el diagnóstico de PPC en las niñas. Sin embargo, la evaluación de testosterona en los niños sí resulta de utilidad (52).



### 2.1.3.3 Pruebas de imagen

La realización de una radiografía de la mano y muñeca izquierdas en mayores de 2 años, para el cálculo de la edad ósea mediante el método de Greulich-Pyle (99) puede ayudar al diagnóstico puesto que en la PPC se objetiva adelanto de la edad ósea (52,57,100).

La realización de pruebas de ultrasonidos (ecografía abdominal, testicular y pélvica) será de utilidad ante la sospecha de pubertad precoz periférica-(52,57,59).

Finalmente, ante una PPC es obligado la realización de RM craneal ante la elevada prevalencia de patología del SNC, tanto en niños como en niñas.(2,52,57,59). Aunque, en niñas mayores de 6 años sin datos clínicos sugerentes de patología del SNC sólo se evidencian alteraciones en la RM craneal en 0-2% de los casos (57,100).

### 2.1.3.4 Estudios genéticos

En los últimos años, en vista del descubrimiento de las alteraciones en el gen *MKRN3* en las pacientes con PPC se ha planteado la inclusión del estudio de este gen en los algoritmos diagnósticos de los pacientes con PPC sobre todo en los casos familiares de PPC. En esta línea, *Latronico et al* (57), plantean que el estudio de *MKRN3* debería realizarse en los casos familiares de PPC incluso antes de realizar una RM cerebral.

## 2.1.4 Problemas asociados a la PPC

Las consecuencias de un adelanto patológico de la pubertad son:

- **Talla:** existe una pérdida del potencial de talla genética en las niñas y niños con PPC. Los datos provenientes de series históricas de pacientes no tratados nos han permitido constatar que la talla final era en promedio 152 cm en niñas y 156 cm en niños, lo que representaría una pérdida de potencial de talla > 10 cm en niñas y > 20 cm en los niños (101).
- **Trastornos de conducta y psicopatología:** la pubertad es un periodo de transición de máxima vulnerabilidad psicológica. De esta forma, la aparición temprana de caracteres sexuales secundarios se ha relacionado con problemas emocionales y de comportamiento conducentes a incrementar conductas de riesgo (consumo de sustancias tóxicas, trastornos de la conducta alimentaria, actividad sexual temprana, entre otras)

(52,58,102). Estos datos provienen en su mayoría de estudios descriptivos retrospectivos que analizan pubertades adelantadas (menarquia antes de los 11 años). Lamentablemente, no disponemos de un número relevante de estudios prospectivos con un número significativo de pacientes con PPC con y sin tratamiento frenador de la pubertad para constatar la aparición de estas alteraciones (52,100).

- **Riesgo de desarrollar cáncer:** existen evidencias de que la edad de la menarquia afecta el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Un metaanálisis publicado en 2012 por el Grupo de trabajo en Factores Hormonales en Cáncer de Mama (103) demostró que el riesgo de padecer cáncer de mama se eleva en un factor de 1,05 (95% intervalo de confianza 1,04-1,06;  $p < 0,0001$ ) por cada año de adelanto de la menarquia, poniendo como referencia la edad de 13 años para un riesgo relativo (RR) de 1, es decir, que las mujeres cuya menarquia ocurre alrededor de los 10 años tienen un RR 1,2 veces mayor que las mujeres cuya menarquia ocurre a los 13 años(103). La relación causal de este riesgo parece estar relacionado con el aumento del tiempo de exposición al estímulo estrogénico al que está sometido el tejido mamario en las mujeres con menarquia más temprana (102,103). Esto hace pensar que las pacientes con PPC podrían tener un riesgo mayor que la población general, pero no existen estudios suficientes en esta subpoblación que avalen esta hipótesis (52). En cuanto al cáncer de endometrio, en 2015 un metaanálisis demostró que existe una relación inversa entre la edad de la menarquia y la aparición de este tipo de cáncer (52,104).
- **Obesidad y riesgo cardiovascular:** las niñas obesas tienden a iniciar la pubertad antes que las niñas sin exceso de peso. Por otro lado, la menarquia temprana se ha relacionado con aumento del índice de masa corporal (IMC) en la edad adulta(102). En suma, es muy difícil distinguir si es la obesidad la que condiciona el adelanto puberal o si es éste adelanto, el que condiciona una mayor ganancia de peso (52). Estudios prospectivos realizados en mujeres adultas han encontrado un aumento del riesgo de eventos cardiovasculares (ECV) en las mujeres con menor edad de la menarquia. En el estudio de *Lakshman et al* (105) el punto de corte fue de menarquia a una edad menor a 12 años [ $n=3888$ , RR de ECV 1,17 (1,07-1,27)]. *Canoy et al* (106) mostraron que tanto menarquias adelantadas ( $< 10$  años) como retrasadas ( $> 17$  años) producían un incremento notable del riesgo cardiovascular. Este aumento de riesgo de ECV se mantenía al ajustar por edad, actividad física, IMC y circunferencia abdominal, entre otros (105,106). Una vez más, los datos referentes a la PPC son escasos. *Lazar et al* (107) analizaron una cohorte compuesta por mujeres con antecedente de PPC tratadas con análogos de GnRH y no

tratadas. Fueron evaluadas entre la tercera y cuarta década de la vida no había diferencias en prevalencia de exceso de peso ni riesgo cardiovascular entre los dos grupos incluidos.

### 2.1.5 Tratamiento de la PPC

Con el objetivo de evitar las consecuencias asociadas a PPC anteriormente descritas se plantea el tratamiento de esta entidad clínica. Para ello, desde hace tres décadas, se vienen empleando análogos de GnRH. Dichos análogos han ido cambiando en cuanto a su vía e intervalo de administración. En Europa, el tratamiento más extendido es la triptorelina intramuscular de administración mensual. Se ha mostrado como un tratamiento seguro y eficaz (1,52,57,59).

En estos momentos existen varios estudios en desarrollo con nuevas terapias: leuprolide trimestral, triptorelina semestral e implantes de histrelina anual (57,59,100).

## 2.2 Hipogonadismo

Se define pubertad retrasada cuando no se evidencia telarquia en niñas a partir de los 13 años y el volumen testicular permanece por debajo de 4 ml en niños por encima de los 14 años. Por otra parte, definimos como pubertad detenida aquella que, iniciada tardíamente o no, no llega a completarse después de 4-5 años desde su inicio. Finalmente, se entiende como amenorrea primaria, la ausencia de menarquia a los 16 años (58).

Se define hipogonadismo como el fallo en la producción de esteroides sexuales por las gónadas sexuales. Éste puede ser secundario a un fallo del eje hipotálamo-hipófisis, en cuyo caso se conoce como hipogonadismo hipogonadotrópico, o puede deberse a alteración de las gónadas, lo que se conoce como hipogonadismo hipergonadotrópico (58).

### 2.2.1. Clasificación etiopatogénica del hipogonadismo

El hipogonadismo se clasifica según la adecuada o inadecuada secreción de gonadotropinas, en la tabla 3 se recogen las causas del hipogonadismo.

En este trabajo nos centraremos en el hipogonadismo hipogonadotropo permanente (HHP).

### 2.2.2 Hipogonadismo Hipogonadotropo Permanente (HHP)

Ocurre cuando existe un problema en la producción, secreción o acción de las gonadotropinas. Como se mencionó anteriormente, puede ser adquirido o congénito. A su vez, puede ser aislado, cuando solo se afecta la producción de gonadotropinas o acompañarse de deficiencias hormonales múltiples (8). Ocurre hasta en un 10% de los niños y 20% de las niñas que presentan retraso puberal (58).

El HHP congénito (HHPc) suele ser aislado, es decir, sin afectación de otras vías hormonales hipofisiarias. Cuando se acompaña de anosmia o microsmia se denomina síndrome de Kallmann (SK) (6,8,108). Puede estar asociado a malformaciones o alteraciones del desarrollo tales como defectos del paladar, labio leporino, agenesia dental, alteraciones de los pabellones auriculares, hipoacusia neurosensorial, agenesia renal, sincinesias bimanuales o movimientos en espejo, o alteraciones esqueléticas (7,8,109,110).

El HHPc tiene una prevalencia de 1:10.000 personas, con un predominio en varones relación hombre:mujer 3-5:1. Las formas familiares, son la minoría y siguen múltiples patrones de herencia: autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado al cromosoma X recesivo, y hasta en el 20% de los casos hay evidencia de herencia oligogénica (8,109-113).


Hipogonadismo hipogonadotropo permanente	Hipogonadismo hipogonadotropo funcional o transitorio	Hipogonadismo Hipergonadotropo
<p><b>1. Congénitos</b></p> <p>a) <u>Aislados</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Con anosmia:</b> Síndrome de Kallmann</li> <li>- <b>Sin anosmia:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Por alteración de la generación de pulsos de GnRH.</li> <li>• Alteraciones del desarrollo de la región Hip-Hipo: <i>NROB1</i> (DAX1, asociado a hipoplasia suprarrenal).</li> <li>• Alteración de la secreción de gonadotropinas hipofisarias.</li> <li>• Asociados a obesidad.</li> </ul> </li> </ul> <p>b) <u>Asociados</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>A otras alteraciones hipofisarias (GH, TSH, PRL y/o ACTH):</b> <i>HESX1, LHX3, LHX4, PROP1</i>.</li> <li>- <b>A cuadros sindrómicos(111):</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome Prader Willi: hipotonía, DI, alteraciones de conducta, obesidad e hiperfagia, HHPc(región 15q11.2 paterna).</li> <li>• Síndrome de CHARGE: coloboma, cardiopatía, atresia de coanas, DI, anomalías genitales y de los oídos (<i>CHD7, SEMA3E</i>).</li> <li>• Síndrome de Laurence-Moon: coriorretinopatía, paraplejía espástica, disfunción hipofisiaria (<i>PNPLA6</i>).</li> <li>• Síndrome de Bardet-Biedl: retinitis pigmentaria, obesidad, disfunción renal, polidactilia, alteraciones de conducta e HHPc (al menos 19 genes).</li> <li>• Síndrome Gordon Holmes ataxia cerebelosa +/- distrofia de retina (<i>OTUD4, RNF216, STUB1</i>).</li> <li>• Síndrome 4H: HHPc, hipomielinización e hipodontia (<i>POLR3A, POLR3B</i>).</li> <li>• Síndrome Warburg Micro: microcefalia microcórnea, DI, AO (<i>RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB18, TBC1D20</i>).</li> <li>• Síndrome de Bosma, arrinia y microftalmia, hipoplasia medio facial (<i>SMCHD1</i>).</li> <li>• Síndrome de poliendocrinopatía y polineuropatía con DI (<i>DMXL2</i>).</li> </ul> </li> </ul> <p><b>2. Adquiridos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumores y tratamiento con radioterapia.</li> <li>• Procesos infiltrativos (histiocitosis, sarcoidosis, hemocromatosis).</li> <li>• Tras infección del SNC.</li> <li>• Secundarios a traumatismos.</li> <li>• Post-cirugía.Tras radioterapia.</li> </ul>	<p>Trastornos de la conducta alimentaria.</p> <p>Deporte de alta competición.</p> <p>Patología oncológica.</p> <p>Desnutrición grave:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Enfermedad celíaca.</li> <li>✓ Enfermedad inflamatoria intestinal.</li> </ul> <p>Enfermedades endocrinológicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ DM tipo 1 mal controlada.</li> <li>✓ Hiperkortisolismo.</li> <li>✓ Hiperprolactinemia.</li> </ul> <hr/> <p><b>Variante de la normalidad</b></p> <p style="text-align: center;"></p> <p><b>Retraso constitucional del crecimiento y la pubertad</b></p>	<p><b>1) Congénitos</b></p> <p>a) <b>Niños</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Síndrome de Klinefelter (47, XXY y variantes).</li> <li>- Trastornos de la diferenciación sexual 46, XY.</li> <li>- Rasopatías: síndrome de Noonan.</li> <li>- Distrofia miotónica.</li> </ul> <p>b) <b>Niñas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Síndrome de Turner (45, X y variantes).</li> <li>- Trastornos de la diferenciación sexual 46, XX.</li> <li>- Galactosemia.</li> </ul> <p><b>1. Adquiridos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tumores.</li> <li>- Torsión gonadal bilateral.</li> <li>- Tratamiento con quimio/radioterapia.</li> <li>- Orquitis bilaterales.</li> <li>- Fallo ovárico precoz idiopático o autoinmune.</li> </ul>

Tabla 3. Clasificación del HH según su causa, adaptado de Soriano et al (58). DI: discapacidad intelectual. DM: diabetes mellitus, AO: atrofia óptica, Hip-Hipo: hipotálamo-hipófisis. En cursiva el nombre de los genes asociados.

### *2.2.2.1 Clasificación etiopatogénica del HHP congénito*

El HHP congénito puede producirse por alteraciones en cualquier punto a lo largo de un complejo entramado que comienza en la vida embrionaria, con el desarrollo de las neuronas productoras de GnRH en la placoda nasal hasta la puesta en marcha de la producción de pulsos de GnRH que efectivamente estimulen la producción de gonadotropinas. Ver figura 8

Se han encontrado alteraciones en los genes que participan en cada uno de los puntos de este proceso, a saber:

- Defectos en genes relacionados con la diferenciación neuronal, ocasionan que las neuronas productoras de GnRH no puedan salir de la placoda nasal para iniciar la migración (6,8,108,110,114).
- Durante la migración neuronal intervienen muchos factores quimioatrayentes, receptores de membrana, factores de transcripción que de no funcionar bien impiden la llegada al hipotálamo de estas neuronas (7,110,115-119).
- Una vez en el hipotálamo, las neuronas deben crear una red de conectividad sináptica que requiere la expresión de genes específicos y la recepción de estímulos neurohumorales. Los fallos en este proceso impiden la viabilidad de estas neuronas (109-111,120,121).
- Una vez instaladas en el hipotálamo las neuronas deben ser capaces de producir GnRH en pulsos de intensidad crítica, que como hemos visto, es un proceso complejo, que necesita la expresión coordinada de múltiples genes (7,8,15,109,111,121,122).
- Por último, la GnRH debe ser capaz de estimular en las células hipofisiarias la producción de LH y FSH, por lo que las alteraciones en los receptores de GnRH o en la producción de gonadotropinas puede también afectar al producto final de este proceso (8,108-111,121,122).

Se han descrito alteraciones genéticas que afectan cada uno de los puntos descritos anteriormente, esto conlleva a que existan genotipos y fenotipos muy variables en los pacientes con HHP congénito. A continuación, detallaremos los tipos de HHP congénito y sus causas.

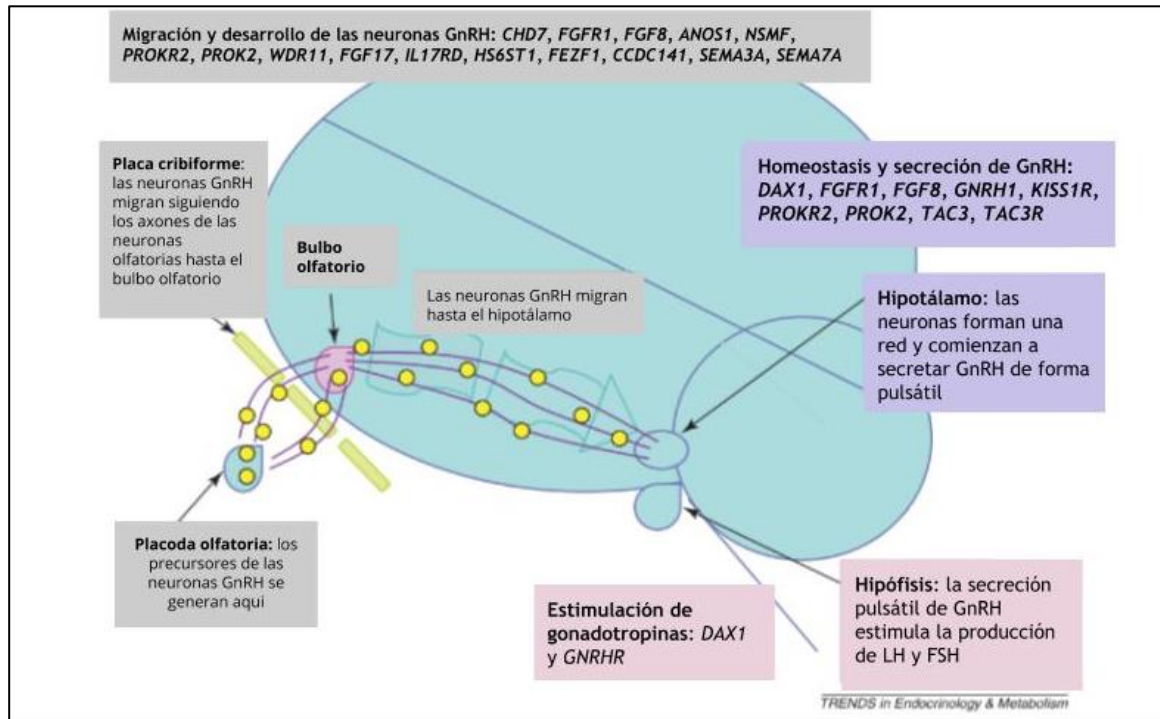


Figura 8. Diagrama del “camino” que siguen las neuronas desde su generación en la placoda olfatoria hasta el hipotálamo. Se muestran los genes implicados en cada parte del proceso. Adaptado de *Mitchell et al (110)*.

#### 2.2.2.1.1 Síndrome de Kallmann (SK)

Descrito por primera vez en 1944 por *Kallmann et al (123)*, quienes observaron la cosegregación de anosmia e hipogonadismo en individuos procedentes de 3 familias (123). En 1954, *De Morsier (124)*, describió la hipoplasia de los bulbos olfatorios en pacientes con hipogonadismo. En estos momentos se estima que representa el 50-60% de los casos de HHPc (8,110,121).

Como hemos visto, las neuronas productoras de GnRH nacen en la placoda olfatoria y deben migrar durante el desarrollo embrionario hacia su lugar definitivo en el hipotálamo. Cualquier alteración que afecte a esta migración puede dar lugar al SK (6,8,108,114).

Las neuronas productoras de GnRH migran en asociación con los axones de las neuronas olfatorias siguiendo tres pasos sincronizados: i) extensión del polo que “lidera” la migración, ii)

translocación del núcleo hacia el polo líder, *nukleokinesis*, iii) eliminación del polo que queda atrás en el proceso de migración(7,108).

Múltiples grupos de moléculas han sido implicadas como factores que guían a las neuronas productoras de GnRH en su camino, moléculas de adhesión como: anosmina 1, molécula de adhesión neural del ácido polisialílico (PSA-NCAM) y el glicoconjugado de superficie celular (7,115,125). También están: el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la colecistoquinina, el factor de crecimiento fibroblástico 8, la prokinetina 2 (PROK2), las efrinas, el factor LHRH embrionario nasal (NELF), las semaforinas, las plexinas y la reelina, el factor de crecimiento del hepatocito (HGF), el Axl, el Tyro3 y las citoquinas atrayentes(7).

Muchos de los factores descritos anteriormente han sido implicados de manera directa en la aparición del SK, producido por alteraciones en los genes que los codifican. De tal forma que se han descrito más de 30 genes relacionados, pudiéndose llegar a un diagnóstico molecular hasta en el 50% de los casos (7,108,111). En la tabla 4 se recogen las proteínas implicadas, los genes que las codifican, su ubicación genómica, el fenotipo asociado a este gen y el patrón de herencia que sigue su alteración (7,8,23,108-111,113,114,118,120-122,126-128). Es importante resaltar que, aunque todos estos factores intervienen en la migración neuronal y que la patología asociada a éstos puede o no incluir alteración del olfato (8,109,111).

El SK puede seguir un patrón de herencia autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al cromosoma X recesivo. Además, se ha demostrado la existencia de la herencia oligogénica, en donde el fenotipo se explica por variantes patogénicas en dos o más genes. A día de hoy este tipo de patrón de herencia explica alrededor del 20% de los casos de SK (8,109-111,121). El trabajo de *Dodé et al* (113) en 2006 fue el primero en plantear la implicación de alteraciones en dos genes en pacientes con HHPc al encontrar en una serie de pacientes con HHPc con y sin alteraciones del olfato, familiares y esporádicos, variantes consideradas patogénicas en heterocigosis, homocigosis o heterocigosis compuesta en los genes *PROK2* y *PROKR2*. Además, en un paciente con una variante en heterocigosis en el gen *PROKR2* se encontró una variante en hemigigosis en el gen *ANOS1* considerada patogénica.

Actualmente se piensa que los pacientes con alteraciones en los genes *PROK2* y *PROKR2* deben tener variantes patogénicas bialélicas (lo que corresponde a un patrón de herencia autosómico recesivo), y si sólo se demuestra la presencia de una variante monoalélica en alguno



de estos dos genes, deben tener una variante patogénica en alguno de los otros genes relacionados con HHPc, lo que correspondería a un patrón de herencia oligogénico, en estos casos el fenotipo puede ser muy variable(119). Posteriores trabajos y revisiones han postulado la herencia oligogénica para los genes *FGFR1*, *NSMF*, *HS6ST1*, *FGF8*, *SPRY4*, *DUSP6*, *IL17RD* y *FLRT3* (7,109-111,113,114,118,119). En esta línea, mientras se caracterizan más genes, la proporción de casos atribuibles a una herencia oligogénica es mayor, por lo que no es descabellado plantear que este tipo de herencia sería mayoritaria en los pacientes con HHPc (110).

En la tabla 4 se resumen las proteínas implicadas y sus genes codificantes, se muestran en orden de frecuencia de aparición en pacientes con HHPc y SK.

Tabla 4. Resumen de las proteínas implicadas en la generación, migración y homeostasis de las neuronas productoras de GnRH. Se detalla la función de cada una, el gen que la codifica, los síntomas asociados a su disfunción, el patrón de herencia asociado a la misma, porcentaje que representan en la etiopatogenia del SK y del HHPc, y si se ha demostrado o no su participación en la herencia oligogénica. Se muestran ordenados por la frecuencia y agrupados por ruta metabólica implicada.

Localización OMIM#	Gen Proteína	Función	Síntomas asociados	Fenotipo/ Penetrancia Tipo de variante	Patrón de herencia % del total de casos Contribución a la oligogenicidad
Xp33.31 300836	<b>ANOS1</b> Anosmina-1	Glicoproteína de la matrix extracelular embrionaria de membrana que sirve de guía en la MN, es cofactor del FGFR. Fue el primer gen relacionado con el SK.	Sincinesias (70%), agenesia renal (30%), los pacientes suelen presentar criptorquidia bilateral y micropene.	SK Completa LOF	XL ~10% Si
8p11.23 147950	<b>FGFR1</b> Receptor de membrana del FGF	Su activación es necesaria para la adecuada MN, Diferenciación y supervivencia de las neuronas productoras de GnRH. Interviene en la morfogénesis del telencéfalo, en especial bulbos olfatorios.	Paladar hendido (30%), hipoacusia, agenesia dental, agenesia de cuerpo calloso, hipoplasia de pabellones auriculares, anomalías esqueléticas, coloboma de iris, pérdida del cartilago nasal.	SK/ HHPcn Incompleta LOF	AD ~7-10% Si
10q24.32 600483	<b>FGF8</b> Factor de crecimiento fibroblástico 8	Ligando más importante de FGFR1. Esencial para el desarrollo embrionario del prosencéfalo, sistema olfatorio, neuronas GnRH, esqueleto y corazón.	Hipoacusia neurosensorial, defectos del paladar, aplanamiento del puente nasal, camptodactilia e hiperlaxitud.	SK/HHPcn Incompleta LOF	AD <2 Si
8p21.3 603725	<b>FGF17</b> Factor de crecimiento fibroblástico 8	Segundo ligando más importante de FGFR1, tiene 67% de homología con FGF8	En algunos pacientes ocurren alteraciones del paladar	SK/HHPcn Incompleta LOF	AD?/O Raro Si
4p14 611135	<b>KLB</b> Klotho beta	Co-receptor de FGF21 (producido en el hígado y de expresión postnatal) para la unión y activación del FGFR1(129).	Obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina	SK/HHPcn Incompleta LOF	O/AD Raro Si
3p14.3 615267	<b>IL17RD</b> Receptor D interleucina17	Interacciona con el dominio intracelular de FGFR1.	Hipoacusia neurosensorial	SK/HHPcn Completa LOF	AR/O ~3 Si
2q14.3 604846	<b>HS6ST1</b> Enzima heparan sulfato6-O sulfotransferasa	FGF8 y el heparan sulfato, en presencia de anosmina1 se unen a FGFR1 que activa la cascada de señalización.		SK/HHPcn Incompleta LOF	AD?/O Raro Si
9q34.3 608137	<b>NSMF (NELF)</b> Factor liberador de LH embrionaria nasal	Molécula de la matriz extracelular, sirve de guía a los axones olfatorios y neuronas GnRH		SK/HHPcn ¿Incompleta? LOF	AD?/O Raro Si

Localización OMIM#	Gen Proteína	Función	Síntomas asociados	Fenotipo/ Penetrancia Tipo de variante	Patrón de herencia % del total de casos Contribución a la oligogenicidad
5q31.3 607984	<i>SPRY4</i> Homóloga a <i>sprouty 4</i>	Proteína implicada en la vía del FGF8.	Defectos craneofaciales, desarrollo anormal de miembros.	SK/HHPcn Incompleta LOF	AD?/O Raro Si
12q21.33 602748	<i>DUSP6</i> Fosfatasa de especificidad dual 6	Proteína implicada en la vía del FGF8. De la superfamilia de las tirosin-fosfatasas basadas en cisteína tipo 1.	Defectos craneofaciales, hipoacusia.	SK/HHPcn Incompleta LOF	AD?/O Raro Si
3p13 607002	<i>PROK2</i> Prokineticina 2	Sustancia quimioatrayente y su receptor (acoplado a proteína G) para los progenitores de neuronas GnRH, producido por las neuronas del núcleo supraquiasmático que regula el ciclo circadiano. Regula la formación del bulbo olfatorio y la migración de las neuronas GnRH.	La presentación AR puede incluir obesidad, epilepsia, trastorno de sueño, displasia fibrosa y sincinesia.	SK/HHPcn Incompleta LOF	AR/O ~3-6 Si
20p12.3 607123	<i>PROKR2</i> Receptor de Prokine- tica 2				
7q31.31 613301	<i>FEZF1</i> Familia de los dedos de zinc tipo FEZ 1	Represor transcripcional con expresión selectiva durante la embriogénesis en el epitelio olfatorio, amígdala e hipotálamo. Facilita la entrada de las neuronas olfatorias y productoras de GnRH al SNC.		SK Completa LOF	AR Raro No
2q31.2 616031	<i>CCDC141</i> Proteína con dominios de hélice superenrollada 141	Se expresa en las neuronas GNRH, relacionada con la migración neuronal pero que no afecta el crecimiento axonal de las neuronas olfatorias.		HHPcn ¿Completa? LOF	AR Raro 4 familias
7q21.11 603961	<i>SEMA3A</i> Semaforina 3ª	Proteína secretada y de membrana que forma un complejo con la neuropilina 1 y la plexina 1. Sirve de guía inhibiendo la motilidad, señal de “llegada” del crecimiento axonal.		SK Incompleta LOF	AD/O Raro Si
7q21.11 608166	<i>SEMA3E</i> Semaforina 3E	Proteína secretada y de membrana que sirve de señal para la supervivencia de las neuronas que, tras migrar, maduran en el hipotálamo.	Síndrome de CHARGE	SK ¿Incompleta? LOF	AD/O Raro Si
15q24.1 607961	<i>SEMA7A</i> Semaforina 7ª	Proteína de membrana de la familia de las semaforinas que interactúa con los receptores de integrina. Promueve el crecimiento axonal.		SK/HHPcn Incompleta LOF	O/AD? Raro Si
22q13.1 602229	<i>SOX10</i> <i>SRY-related HMG-box</i> 10	Factor de transcripción de la familia SOX relacionado al factor de transcripción relacionado a la maduración testicular SRY. Regula el Desarrollo de la cresta neural.	Hipoacusia neurosensorial, hipopigmentación del iris, enfermedad de Hirschsprung. Síndrome de Waardenburg-Shah	SK Completa LOF	AD ~2 No
19q13.2 109135	<i>AXL</i> Miembro de la subfamilia de receptores tirosin-kinasa Tyro3-Axl-Mer (TAM)	Receptor expresado en las neuronas GnRH. En modelo murino se ha relacionado con la migración de las neuronas GnRH.		SK/HHPcn ¿Incompleta? LOF	AD? Raro No

Localización OMIM#	Gen Proteína	Función	Síntomas asociados	Fenotipo/ Penetrancia Tipo de variante	Patrón de herencia % del total de casos Contribución a la oligogenicidad
8q12.2 608892	<b>CHD7</b> Proteína fijadora de ADN- <i>Chromo- domain</i> helicasa	Factor remodelador de la cromatina, que regula la transcripción de otros genes importantes en el desarrollo embrionario.	Síndrome CHARGE (coloboma, alteraciones cardíacas, atresia de coanas, DI, anomalías genitales y alteraciones del oído externo con o sin hipoacusia neurosensorial e hipoplasia de los canales semicirculares) los pacientes con HHPc pueden o no, presentar manifestaciones sutiles de CHARGE (117)	SK/HHPcn Completa LOF	AD ~6 No
10q26.12 606417	<b>WDR11</b> Proteína con repeticiones WD 11	Coopera con el factor de transcripción <i>EMX1</i> en la activación de la expresión y producción de GnRH.		SK/HHPcn ¿Incompleta? LOF	O/AD Raro Si
3p14.3 601805	<b>HESX1</b> Factor de transcripción Expresado en células primordiales embrionarias	Se expresa precozmente en el primordio hipofisiario embrionario, es necesario para la diferenciación de las células hipofisiarias.	Displasia septo-óptica deficiencia combinada de hormonas hipofisiarias.	SK ¿Incompleta? LOF	AD? Raro No
20p12.1 604808	<b>FLRT3</b> Proteína de membrana rica en repeticiones de leucina tipo 3	Actúa en la adhesión célula-célula, implicada en la guía de la migración neuronal y crecimiento axonal, puede ejercer un rol de repulsión o atracción de la migración dependiendo de su patrón de interacciones. Implicada en la cascada de eventos producidos por el FGF. Necesaria para la morfogénesis durante el periodo.	Defectos del tubo neural. Defectos craneofaciales	SK ¿Incompleta? LOF	AD/O Raro Si

MN: migración neuronal. SK: síndrome de Kallmann. HHPcn: hipogonadismo hipogonadotropo permanente congénito sin alteración de la olfacción. FGF: factor de crecimiento de los fibroblastos. LOF: pérdida de función. AD: Autosómico Dominante. AR: Autosómico Recesivo. O: oligogénico. DI: discapacidad intelectual.

### 2.2.2.1.2 Hipogonadismo hipogonadotropo permanente congénito (HHPc) sin alteración del olfato

Ocurre por alteración en los genes relacionados con la síntesis y acción de la GnRH. Aunque, como hemos visto en el apartado anterior existen alteraciones genéticas relacionadas con la migración y asentamiento de las neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo que también pueden presentar el fenotipo de HHPc sin alteración del olfato. En la tabla 5 se recogen las proteínas implicadas, los genes que las codifican, su ubicación genómica, el fenotipo asociado a este gen y el patrón de herencia que sigue su alteración (7,8,23,108-111,113,114,118,121,122,126-128). Algunos genes relacionados con la producción de SK también se asocian con el fenotipo de HHPc sin alteración del olfato, por lo que se plantea que la anosmia/microsmia pueda sufrir un fenómeno de penetrancia incompleta y/o expresividad variable (122). Los genes relacionados con el SK que pueden dar un fenotipo sin alteración del olfato se recogen en la tabla 4.

Tabla 5. Resumen de las proteínas implicadas en la homeostasis y secreción de GnRH. Se detalla la función de cada una, el gen que la codifica, los síntomas asociados a su disfunción, el patrón de herencia asociado a la misma, porcentaje que representan en la etiopatogenia del HHPc y si se ha demostrado o no su participación en la herencia oligogénica.

Localización OMIM#	Gen Proteína	Función	Síntomas asociados	Fenotipo/ Penetrancia Tipo de variante	Patrón de herencia % del total de casos Contribución a la oligogenicidad
8p21.2 614841	<i>GNRH1</i> Hormona liberadora de gonadotropina1	Estimula la secreción de gonadotropinas LH y FSH.		HHPcn Completa LOF	AR Raro No?
4q13.2 614841	<i>GNRHR</i> Receptor de GnRH	Receptor acoplado a proteína G, expresado por las células gonadotropas.		HHPcn Completa LOF	AR 17% Si
1q32.1 614842	<i>KISS1</i> Kispeptina 1	Estimula la transcripción de GnRH. El receptor es asociado a proteína G, expresado en neuronas GnRH		HHPcn Completa LOF	AR <2% No
19p13.3 614837	<i>KISS1R</i> Receptor de kispeptina 1				AR <2% Si
12q13.3 614839	<i>TAC3</i> Neurokinina B	Estimula la transcripción de kispeptina1 y de GnRH. El receptor es asociado a proteína G, expresado en neuronas GnRH y KNDy	En ocasiones puede revertir después de un tiempo en tratamiento	HHPcn Completa LOF	AR <2% Si
4q24 614840	<i>TACR3</i> Receptor de neurokinina B				
19q13.33 152780	<i>LHB</i> Hormona luteinizante B	Gonadotropina que estimula la producción de esteroides sexuales		HHPcn Completa LOF	AR Raro No
11p14.1 136530	<i>FSHB</i> Hormona folículo estimulante B	Gonadotropina que estimula la producción de esteroides sexuales		HHPcn Completa LOF	AR Raro No

Localización OMIM#	Gen Proteína	Función	Síntomas asociados	Fenotipo/ Penetrancia Tipo de variante	Patrón de herencia % del total de casos Contribución a la oligogenicidad
5q15 162150	<b>PCSK1</b> Convertasa neuroendocrina 1	Necesario para el procesamiento de varias pre-hormonas incluyendo proopiomelanocortina, proinsulina y proglucagon.	Obesidad mórbida, alteración del metabolismo de los carbohidratos	HHPcn Completa LOF	AR Raro No
7q32.1 614962	<b>LEP</b> Leptina	Leptina es una hormona producida en el tejido adiposo que favorece regula la saciedad. Su receptor tiene un solo dominio transmembrana, se expresa en las células de la hipófisis y otros puntos dentro del SNC. Estimula la producción de kisleptina1	Obesidad mórbida	HHPcn Completa LOF	AR
1p31.3 614963	<b>LEPR</b> Receptor de leptina				AR <5% No
Xp21.2 300200	<b>NROB1 (DAX1)</b> Receptor nuclear subfamilia O grupo B miembro 1	Factor de transcripción expresado en la corteza suprarrenal, gónadas, hipotálamo e hipófisis.	Insuficiencia suprarrenal en período neonatal e infantil.	HHPcn Completa LOF	XLR Raro No
3q24 617351	<b>IGSF10</b> Miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas 10	Expresión de la IGSF10 en el mesénquima nasal embrionario, durante la MN de las neuronas productoras GnRH (121,130)	Asociación pendiente con HH.	HHPcn? ¿Incompleta? LOF	AD? Raro No
5q31.3 603819	<b>SRA1</b> ARN Activador del receptor esteroideo	Modula la acción de receptores nucleares, incluyendo ER. Tiene función tanto su ARNm como la proteína	Tres familias descritas(111)	HHPcn? ¿Incompleta? LOF	AR/O Raro Si

HHPcn: hipogonadismo hipogonadotrofo permanente congénito sin alteración de la olfacción. FGF: factor de crecimiento de los fibroblastos. LOF: pérdida de función. AD: Autosómico Dominante. AR: Autosómico Recesivo. O: oligogénico. XLR: herencia ligada al cromosoma X recesiva. MN: migración neuronal. DI: discapacidad intelectual. ER: receptor de estrógenos.

## 2.2.3 Diagnóstico

### 2.2.3.1 Anamnesis y examen físico

Debido a las múltiples etiologías que pueden causar retraso puberal, la realización de una anamnesis minuciosa y un examen físico detallado resultan de suma importancia. Deben recogerse los antecedentes de manera sistemática:

- Historia reciente: edad de aparición de los caracteres sexuales secundarios, si han aparecido. Valoración de peso, talla e IMC en tablas de referencia. Preguntar de forma dirigida hacia la presencia de trastorno de la conducta alimentaria y/o realización de deporte de alta competición, sintomatología sugerente de patología crónica digestiva, endocrina y neurológica. Datos sobre el sentido del olfato, así como ingesta de fármacos (8,58,122).

- Antecedentes personales: presencia de micropene, criptorquidia bilateral o de malformaciones congénitas (defectos de paladar, coloboma, malformaciones del sistema digestivo, dentales, esqueléticas, aparato urinario, cardiopatías, entre otros). Evaluación del desarrollo psicomotor, presencia de manifestaciones neurológicas (sincinesias, ataxia, entre otros). Alteraciones hormonales, déficit visual o auditivo, antecedentes de patología oncohematológica y su tratamiento (8,58).
- Antecedentes familiares: nos permiten identificar patrones de herencia familiar. Debe recogerse la talla y edad de desarrollo puberal de familiares de primer grado, así como datos sobre infertilidad, abortos de repetición, alteración del olfato y malformaciones congénitas (58,110).
- Valoración de datos antropométricos y del estado nutricional. Descripción del fenotipo. Evaluar el grado de desarrollo puberal según la escala de Tanner (telarquia, volumen testicular, pubarquia y axilarquia) y aspecto de genitales externos: en los niños se debe registrar: tamaño del pene, presencia de testículos en bolsas escrotales, grado de desarrollo y coloración de éstas, reflejar la presencia de ginecomastia; y en las niñas: tamaño del clítoris, aspecto de labios mayores y menores, presencia de himen imperforado. Explorar fondo de ojo junto al sentido del olfato y de la audición (58).

### 2.2.3.2 Pruebas hormonales

Tras descartar trastorno de la conducta alimentaria, deporte de competición o posibles causas de HH funcional, se valorarán los siguientes estudios hormonales para el diagnóstico de HHP (8,109,110,122):

- Estudio basal de testosterona (niño) y 17  $\beta$ -estradiol (niña) junto a gonadotropinas (FSH y LH): de utilidad para el diagnóstico diferencial entre hipogonadismo hipergonadotropeo e HHP.
- Prueba de estimulación con hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), descrita para el diagnóstico de PPC. Cuando el pico de LH es inferior a 5 UI/l hay una sospecha de HHP, aunque en ocasiones es difícil distinguir del retraso constitucional del desarrollo.
- Inhibina B: marcador de la célula de Sertoli, útiles para diferenciar retraso constitucional del desarrollo y HHP puesto que, en estos últimos, se encuentra anormalmente disminuida.

Ante la sospecha de HHP, deberemos descartar la afectación de otras áreas hipofisarias evaluando función tiroidea, prolactina, eje somatotropo y eje corticotropo.

#### *2.2.3.3 Pruebas de imagen*

La realización de una radiografía de la mano y muñeca izquierdas para el cálculo de la edad ósea mediante el método de Greulich-Pyle (99) permite valorar el tiempo de maduración, para evaluar si es acorde o retrasada con respecto a la edad cronológica.

Por otra parte, la realización de una ecografía abdominal irá destinada a descartar malformaciones congénitas renales ante la sospecha de un SK. Ante la sospecha de HHP se plantea la necesidad de realizar una RM craneal que nos va a permitir descartar patología orgánica o malformaciones congénitas en área hipotálamo-hipofisaria y/o de los bulbos olfatorios (8,109,110,122).

Por último, en casos de hipogonadismo de larga evolución es posible que sea necesario realizar pruebas que permitan evaluar la mineralización ósea como la densitometría de rayos X de energía dual (DEXA).

#### *2.2.3.4 Estudios genéticos*

Ante la sospecha de hipogonadismo hipergonadotropo, presencia de estigmas sindrómicos, niñas con talla baja de etiología sin filiar y varones en los que se objective discordancia entre el tamaño testicular y el grado de desarrollo puberal, es recomendable la realización de un cariotipo.

El diseño y la sensibilidad de los estudios genéticos ha variado mucho desde el descubrimiento, en 1991, del primer gen asociado al SK, *ANOS1* (antes conocido como *KAL1*) (109). Antes de la aparición de las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (NGS), que permiten el análisis simultáneo de varios genes o incluso el análisis del exoma o genoma completo, el estudio molecular de los pacientes con HHPc tenía poca sensibilidad y se limitaba al estudio de los genes más prevalentes y conocidos, utilizando tanto técnicas de secuenciación clásicas, como la secuenciación Sanger, y técnicas para estudiar los cambios en el número de copia (deleciones/duplicaciones), como lo es la técnica de amplificación de la sonda dependiente de la ligadura múltiplex (MLPA) (8,58).

Actualmente la técnica con mejor rendimiento es la secuenciación del exoma completo filtrado por los genes relacionados al hipogonadismo. Este filtrado se realiza



basándose en el fenotipo del paciente que acompaña al hipogonadismo, es decir, la presencia o no de alteración del olfato, hipoacusia y/o malformaciones. En estos momentos, se estima que la rentabilidad de las pruebas genéticas se encuentra alrededor de un 50% (8,109-111,121,122).

### 2.2.4. Problemas asociados

A pesar de que los pacientes masculinos con hipogonadismo suelen ser infértiles, existe un pequeño grupo de pacientes que tienen un grado de afectación leve, y pueden presentar espermatozoides en el eyaculado(122).

Los pacientes con HHPc suelen presentar talla baja, osteoporosis, problemas de autoestima, distorsión de la imagen corporal y alteración del desarrollo psicosexual. Además, tanto el metabolismo hidrocarbonado como el perfil lipídico pueden encontrarse alterados lo que condiciona un incremento del riesgo cardiovascular (8).

### 2.2.5. Tratamiento

En primer lugar, conviene aclarar que el tratamiento de los hipogonadismos es diferente en las distintas etapas de la vida. De esta forma, en las primeras etapas de la vida debemos abordar varios problemas como son la criptorquidia y/o micropene. Así, se recomienda una corrección quirúrgica lo más temprana posible de la criptorquidia (antes de los dos años), especialmente si es bilateral. En cuanto al micropene, puede ser tratado con dosis bajas de testosterona vía intramuscular (8,58,126).

Con posterioridad, a la edad en la que debería empezar la pubertad los objetivos del tratamiento son (8):

- a) Iniciar y conseguir un desarrollo puberal completo, con una secuencia y ritmo normales de aparición de los caracteres sexuales secundarios.
- b) Lograr la mejor talla adulta posible y prevenir osteoporosis.
- c) Prevenir las complicaciones cardiovasculares y psicosociales asociadas al hipogonadismo.
- d) Adquirir y optimizar la capacidad reproductiva.

Aunque no hay un criterio unánimemente aceptado, en la práctica clínica habitual no es recomendable inducir la pubertad antes de los 13 años de edad cronológica en las niñas ni de los 14 años en los niños. Existen diferentes opciones

terapéuticas que deben pautarse de forma progresiva para remedar en la medida de lo posible un desarrollo puberal normal.

En etapas posteriores nos preocupará la infertilidad. De tal forma que, hoy en día, el HHPc constituye una de las pocas causas de infertilidad tratables, para lo cual, hay distintas modalidades terapéuticas. (8).

Un fenómeno que no comprendemos demasiado bien y que esperamos que en los años venideros el conocimiento científico sea capaz de aclararnos, es el de “reversibilidad”. Así, un porcentaje no desdeñable de HHP con variantes patogénicas en *GNRHR*, *FGFR1*, *TAC3/TACR3*, *CHD7* y *PROKR2* han presentado recuperación espontánea de la secreción de gonadotropinas y esteroides sexuales durante el tratamiento instaurado con esteroides sexuales o gonadotropinas o GnRH (121,122).

### 3.- Estudios genéticos

En el momento actual existen diferentes técnicas que nos permiten detectar diferentes alteraciones genéticas. Clásicamente se habían separado en técnicas citogenéticas, orientadas al estudio y detección de ganancias y pérdidas de material genómico como son el cariotipo y la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Y por otro lado, técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como son la secuenciación Sanger, técnicas de genotipado de SNPs, amplificación de regiones repetitivas o *short tandem repeats*, que permiten construcción de haplotipos, entre otras.

La secuenciación Sanger, ilustrada en la figura 9 tiene la limitación del tamaño del segmento a analizar que es alrededor de unos 500 pares de bases, por lo que el análisis de la región codificante de la mayoría de los genes no era coste-efectiva, por lo que en muchas ocasiones los estudios se centraban en la búsqueda de variantes patogénicas recurrentes, por ejemplo, en el caso del estudio de la fibrosis quística se estudiaban las variantes patogénicas más frecuentes (como la variante p.Phe508del), por lo que la sensibilidad de los estudios no era óptima y analizar todos los exones, en el ejemplo anterior los 27 exones del gen *CFTR*, no era coste-efectivo.

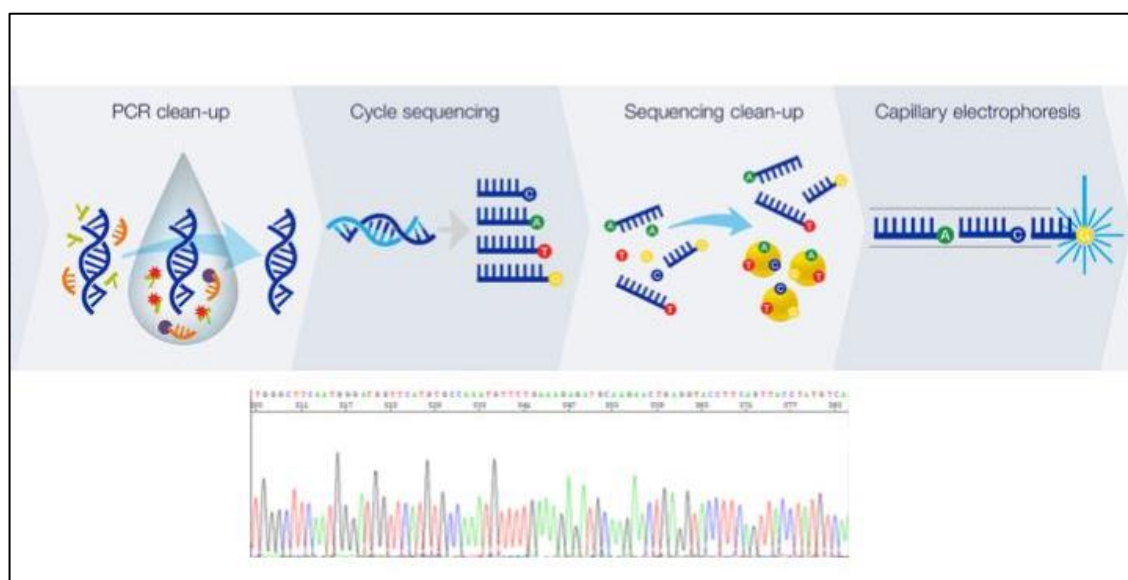


Figura 9. Esquema simplificado de los pasos de la secuenciación Sanger.

Con el paso del tiempo estas técnicas se han ido perfeccionando y han dado paso a la aparición de otras que han revolucionado el diagnóstico genético.

En el campo de la citogenética el estudio de ganancias y pérdidas de material genético se ha refinado desde la aparición de técnica de hibridación comparada con el uso de un arreglo de oligonucleótidos (CGH array), mejor conocido como array-CGH, que permite detectar cambios de número de copia (deleciones/duplicaciones) de pequeño tamaño cuya sensibilidad variará dependiendo de la cantidad de sondas incluidas en la plataforma de análisis, desde alrededor de 100kb para las plataformas de 60K (60.000 sondas) hasta alrededor de 15kb cuando se usa una plataforma de 1M (1.000.000 de sondas). Esta técnica al mezclarse con técnicas de genotipado de SNPs permite una resolución mayor y la capacidad de encontrar regiones con pérdida de heterocigosidad.

Como principal limitación del CGH array tenemos que no es capaz de detectar reordenamientos equilibrados como inversiones y traslocaciones equilibradas.

En el campo de la genética molecular la secuenciación masiva de nueva generación (NGS) ha cambiado radicalmente el abordaje del diagnóstico molecular de muchas patologías, y en muchos casos ha permitido la posibilidad de su estudio, que con las técnicas clásicas no eran abordables. En la siguiente figura se ilustra de manera simplificada los diferentes pasos que incluye la NGS.

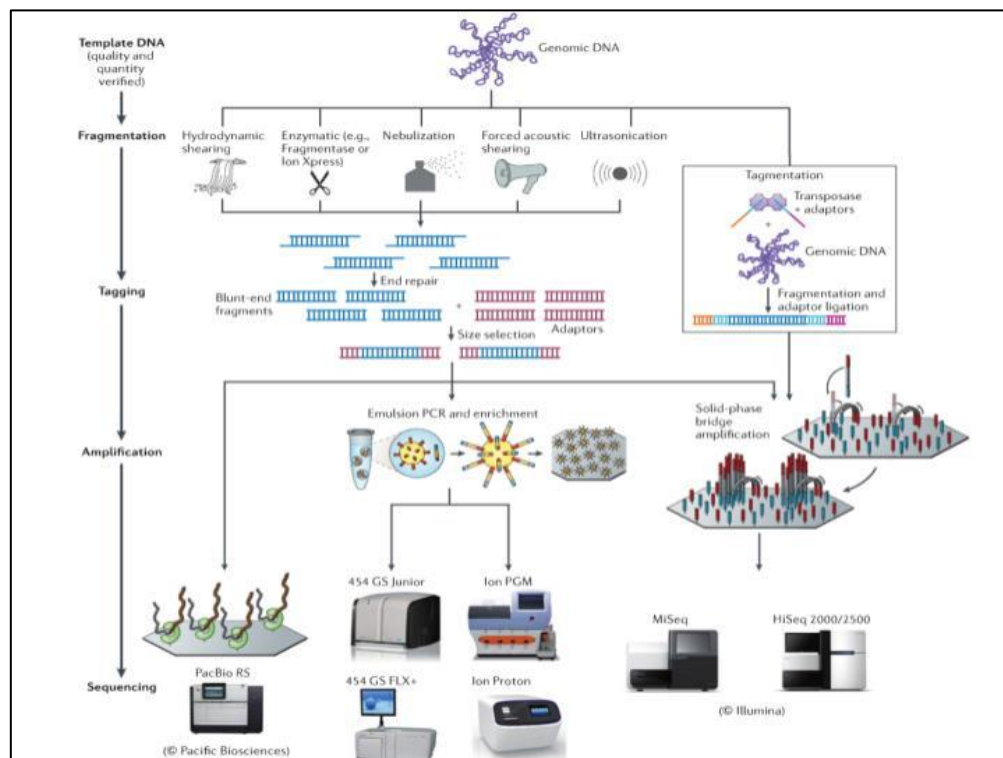


Figura 10. Pasos para la realización de la secuenciación de nueva generación, utilizando diferentes plataformas comerciales. Imagen obtenida de: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html?langsel=/es>.

Estas técnicas que tanto nos ha ayudado en ampliar los conocimientos de las bases genéticas de muchas enfermedades, también nos han traído nuevos retos, como son:

- **Análisis de los datos obtenidos:** al analizar datos de secuenciación masiva nos encontramos cientos o miles de variantes que debemos priorizar y catalogar de la manera más adecuada. Para esto contamos con unos criterios de interpretación de variantes como son: tipo de variante o mutación (cambio de sentido, sin sentido, deleciones/duplicaciones, entre otros, ver tabla 6), localización dentro de la proteína (dominio funcional, si afecta o no el *splicing*), frecuencia poblacional, frecuencia en afectos, segregación familiar, entre otros; estos criterios han sido aplicados por los genetistas de manera intuitiva desde el comienzo de los estudios genéticos, pero en 2015 fueron recogidos, ponderados y publicados por la Academia Americana de Genética Médica y Genómica y la Asociación de Patología Molecular (ACMG) (131). Estos estándares, que ayudan mucho a la hora del análisis de las variantes, tienen limitaciones, por ejemplo: no ser muy efectivas para detectar variantes patogénicas de ganancia de función. Otras herramientas con las que contamos en el área de la Genética Clínica son las numerosas bases de datos, privadas y públicas, de variantes patogénicas (HGMD, ClinVar, LOVD, DECIPHER, Varsome, InterVar, bases de datos exclusivas de cada laboratorio, entre otras), así como bases de datos de variantes frecuentes en la población general (gnomAD, proyecto 1000 genomas SNPs database) que nos ayudan a la hora de categorizar variantes; aun así, todavía contamos con una gran cantidad de variantes que, a día de hoy, no pueden ser catalogadas, lo que se conoce como variantes de significado clínico incierto.
- **Hallazgos no buscados:** en vista del análisis masivo de datos, muchas veces nos encontramos con información que no está relacionada con el motivo de consulta del paciente pero que tiene una gran importancia para su salud o la de sus familiares. Por ejemplo, factores de riesgo para desarrollar cáncer, variantes patogénicas en genes relacionados con patologías degenerativas o de aparición tardía, entre otros. Esta situación debe discutirse en la consulta de asesoramiento genético previa a la realización de la prueba y debe incluirse la decisión del paciente y/o cuidadores de saber o no saber dentro del consentimiento informado. Esta situación es especialmente compleja en el ámbito pediátrico, puesto que los estudios predictivos o de portadores en la edad

pediátrica de forma general salvo que se acompañen de un beneficio real para el menor, no están recomendados (132-134).

En suma, las nuevas técnicas genéticas están contribuyendo de forma notable a mejorar el conocimiento de un gran número de patologías. Paralelamente, esta tecnología conlleva innumerables retos que debemos abordar de manera ética, profesional y multidisciplinar.

Tipo de variante	Efecto	nomenclatura	Ejemplo
Cambio de sentido o missense	El cambio de un nucleótico provoca el cambio del aminoácido en la proteína	c.107A>G; p.Gln36Arg	CAG>CGG Gln>Arg
Cambio sin sentido o nonsense	El cambio de un nucleótico hace que aparezca un codón de parada	c.142G>T; p.Glu48*	GAG>TAG Gln>STOP
Deleciones/duplicaciones sin cambio en el patrón de lectura	Cuando se pierden o se incorporan codones (cada uno formado por 3 nucleótidos), lo que altera la secuencia de aminoácidos pero no el patrón de lectura	c.55_57dup p.Ser19dup	GCCTCCAGC> GCCTCCTCCAGC Ala-Ser-Ser Ala-Ser-Ser-Ser
Delección/duplicación con cambio de patrón de lectura	Delección o inserción de un número de nucleótidos no múltiplo de 3 que cambia el patrón de lectura, por lo que suele cambiar la secuencia de aminoácidos a partir de la variante y normalmente genera la aparición de un codón de parada prematuro o la pérdida del codón de parada nativo	c.932_941delTCACTATAGT p.Val311Leufs*25	GTCCTATAGTTTGG...> GTCCTATAGTTTGG...> GTTGGA...25*
Mutaciones dinámicas o expansiones	En secuencias en donde se repite un número de codones, puede ocurrir la inserción sin cambio de patrón de lectura de más codones, y al superar un número dado de repeticiones se altera la expresión del alelo	c.-128_-126[79];[29] <sup>§</sup>	GGCGGCGGCGGC...79; GGCGGCGGCGGC...29

Tabla 6. Resumen y ejemplos con los tipos de mutaciones; no se incluyen grandes deleciones/duplicaciones, inversiones y traslocaciones. <sup>§</sup>No se coloca correlato en la proteína porque estamos en región intrónica. Entre brackets se coloca el número de repeticiones para cada alelo

# Hipótesis

La etiopatogenia de la Pubertad Precoz Central Idiopática y del Hipogonadismo Hipogonadotropo Congénito Aislado podría estar relacionada con la presencia de variantes patogénicas en genes implicados en la regulación de la expresión de la hormona liberadora de gonadotropinas, siguiendo un patrón de herencia mendeliano. De tal forma que el estudio de estos genes contribuiría a aclarar, al menos en parte, la etiología de las alteraciones del inicio de la pubertad. Asimismo, el conocimiento de las bases moleculares de la patología puberal permitiría ofrecer un adecuado asesoramiento genético a estos pacientes y sus familias.



## Objetivos

1. Estudiar los genes relacionados con la regulación de la expresión de GnRH en una serie de pacientes con Pubertad Precoz Central Idiopática.
2. Elaboración de un protocolo de diagnóstico genético para pacientes con Pubertad Precoz Central Idiopática que permita un adecuado asesoramiento genético.
3. Analizar los genes implicados en la regulación de la expresión de GnRH en una serie de pacientes con Hipogonadismo Hipogonadotropo Congénito Aislado.
4. Diseño de un protocolo de diagnóstico genético para pacientes con Hipogonadismo Hipogonadotropo Congénito que facilite un adecuado diagnóstico a fin de ofrecer un adecuado asesoramiento genético.
5. Describir las características demográficas y clínicas de pacientes con Pubertad Precoz Central Idiopática e Hipogonadismo Hipogonadotropo Congénito y evaluar si existe una posible relación con los hallazgos genéticos encontrados.

## **Pacientes y métodos**

## 1.- Tipo de estudio.

Estudio observacional decriptivo.

## 2.- Lugar de realización.

Servicios de Pediatría y Genética del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (FJD).

## 3.- Población a estudio.

### 3.1.- Pubertad precoz central idiopática (PPCI).

Niños y niñas diagnosticados o en seguimiento con diagnóstico de PPCI, en el Servicio de Pediatría de la FJD desde enero 2.015 hasta diciembre 2.018 con los siguientes criterios:

#### Inclusión

- ✓ Niñas con telarquia progresiva antes de los 8 años.
- ✓ Niños con tamaño testicular  $\geq 4$  ml antes de los 9 años.
- ✓ Diferencia entre edad ósea y edad cronológica  $\geq 1$  año.
- ✓ Pico de hormona luteinizante (LH) tras test de estímulo con hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) superior a 7 UI/l.
- ✓ Estudio de imagen mediante Resonancia Magnética Craneal que excluya patología cerebral.
- ✓ Autorización expresa del estudio.

#### Exclusión

- ✓ Cuadro sindrómico.
- ✓ Patología crónica.
- ✓ Pacientes adoptados.

#### Casos familiares de PPCI:

Se definieron como casos familiares cuando además del caso índice se presentaba, al menos, uno de los siguientes criterios:

- ✓ Madre con menarquia antes de 10 años y/o padre con desarrollo puberal temprano (como posible orientación: afeitado antes de los 12 años).
- ✓ Hermano/hermana y/o primo hermano/hermana con criterios de PPCI.

Variables recogidas, estos datos fueron extraídos de la Historia Clínica:

- ✓ Datos demográficos: fecha de nacimiento, sexo, país de nacimiento, tiempo en España, provincia y ciudad/pueblo de residencia.
- ✓ Datos perinatales: edad gestacional y tipo de parto. Peso y longitud de recién nacidos en valores absolutos y SDS según población de referencia (52,57,60).
- ✓ Antecedentes familiares: datos antropométricos y puberales de ambos progenitores (menarquia de la madre, primer afeitado del padre). Otros casos familiares de pubertad precoz. Cálculo de la talla genética:
  - Niñas:  $[(\text{Talla madre} + \text{Talla padre}/2) - 6,5 \text{ cm}]$  en cm y SDS para la población de referencia (135).
  - Niños:  $[(\text{Talla madre} + \text{Talla padre}/2) + 6,5 \text{ cm}]$  en cm y SDS para la población de referencia (135).
- ✓ Edad de inicio: de telarquia o del aumento del tamaño testicular.
- ✓ En el momento del diagnóstico:
  - Edad ósea mediante el método de Greulich-Pyle (99).
  - Diferencia entre edad ósea y edad cronológica.
  - Peso, talla, IMC en valores absolutos y en SDS para edad y sexo de población de referencia (135).
  - Estadio puberal de Tanner (3,4).
  - Valores de 17-β-estradiol y testosterona. FSH basal y pico tras estímulo, LH basal y pico tras estímulo.
  - Resultado de Resonancia Magnética (RM) Craneal.
  - Ecografía pélvica: longitud uterina (mm) y volumen ovárico (ml).

### 3.2.- Hipogonadismo hipogonadotrofo permanente congénito aislado (HHPc).

Pacientes diagnosticados o en seguimiento en el Servicio de Pediatría y de Endocrinología de la FJD entre enero 2015 y diciembre 2018 de HHPc. A continuación, se describen los criterios de inclusión:

- ✓ Ausencia de telarquia progresiva en niñas mayores de 13 años o niñas que tras cuatro años del comienzo de la pubertad (telarquia) no aparece la menarquia.
- ✓ Falta de incremento del volumen testicular  $\geq 4 \text{ ml}$  (medido con el orquidómetro de Prader) en niños mayores de 14 años o que una vez comenzado el desarrollo

puberal no se completa transcurridos cuatro años (falta de incremento de tamaño testicular, ausencia de cambio de voz, ausencia afeitado).

- ✓ Inexistencia de afectación de otros ejes hormonales: función tiroidea, eje somatotropo, eje corticotropo y secreción de prolactina dentro de la normalidad.
- ✓ Respuesta prepuberal en la prueba de estimulación con hormona liberadora de hormona luteinizante (test LHRH): pico de LH por debajo de 5 UI/L. Además, valores sanguíneos de inhibina B por debajo del percentil 5.
- ✓ Tras descartar una variante extrema de la normalidad: retraso constitucional del crecimiento y pubertad.
- ✓ Tras descartar hipogonadismo hipogonadotrofo funcional asociado a patología crónica.
- ✓ Tras descartar hipogonadismo hipogonadotrofo permanente debido a patología endocraneal (RM craneal normal).
- ✓ Tras descartar hipogonadismo hipogonadotrofo permanente asociado a cuadros sindrómicos.
- ✓ Autorización expresa del estudio.

Variables recogidas, estos datos fueron extraídos de la Historia Clínica:

- ✓ Datos demográficos: fecha de nacimiento, sexo, país de nacimiento.
- ✓ Datos perinatales: edad gestacional y tipo de parto.
- ✓ Peso y longitud de recién nacidos en valores absolutos y SDS según población de referencia (1,52,57).
- ✓ Antecedentes familiares: datos antropométricos y puberales de ambos progenitores (menarquia de la madre, primer afeitado del padre). Casos familiares de hipogonadismo, infertilidad, retraso puberal y anosmia/hiposmia.

Cálculo de la talla genética:

- Niñas:  $[(\text{Talla madre} + \text{Talla padre}/2) - 6,5 \text{ cm}]$  en cm y SDS para la población de referencia (135).
- Niños:  $[(\text{Talla madre} + \text{Talla padre}/2) + 6,5 \text{ cm}]$  en cm y SDS para la población de referencia (135).
- ✓ Antecedentes personales: criptorquidia, micropene, problemas con el olfato.

- ✓ Edad de consulta.
- ✓ En el momento del diagnóstico:
  - Edad ósea mediante el método de Greulich-Pyle (99).
  - Diferencia entre edad ósea y edad cronológica.
  - Peso, talla, IMC en valores absolutos y en SDS para edad y sexo de población de referencia (135) y estadio puberal (3,4).
  - Valores de 17- $\beta$ -estradiol, testosterona, inhibina B.
  - Valores tras test de LHRH: FSH basal y pico tras estímulo, LH basal y pico tras estímulo.
  - Resultado de Resonancia Magnética Craneal.
  - Ecografía pélvica: longitud uterina (mm) y volumen ovárico (ml).
  - Test de UPSIT realizado en el servicio de Otorrinolaringología para valoración de la existencia de alteración en el sentido del olfato (hiposmia/anosmia).

El test UPSIT (Sensory Inc., Haddon Heights, NJ) fue desarrollado en la Universidad de Pensilvania, contiene 40 microcápsulas de olor estandarizadas, su aplicación puede hacerse en una consulta y dura entre 15-20 minutos. Para cada olor el paciente debe escoger 1 de 4 opciones posibles. Los resultados de la prueba pueden ser: olfato adecuado (puntuación: hombres 35-40, mujeres 34-40), anosmia completa (puntuación: 6-18), microsmia severa (puntuación: 19-25), microsmia leve (puntuación: 31-34). Este test ha sido validado y se aplica siguiendo las instrucciones del fabricante (aplicación UPSIT).

### 3.3 Población control

Se recogió un total de 48 muestras de sangre de mujeres caucásicas con edades comprendidas entre los 26 y 67 años, con edad de la menarquía conocida y que estuviese dentro de la normalidad. A fin de estudiar aquellas variantes encontradas en el grupo de PPCI con una frecuencia poblacional mayor a 5%, pero que tuviesen interés por su probable efecto biológico.

## 4.- Estudio hormonal

Test de hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH): se realizó en Hospital de Día del Servicio de Pediatría de la FJD tras ayuno de al menos de 10 horas, entre las 8:00 y 9:00. El procedimiento consistía en canalizar una vía venosa periférica para:

- ✓ Extracción basal de:
  - Niñas: 17-B-estradiol, FSH y LH. Se incluía inhibina B ante sospecha de HHPc.
  - Niños: testosterona, FSH y LH. Se incluía inhibina B ante sospecha de HHPc.
- ✓ Administración de 100 µg/m<sup>2</sup> iv de LHRH.
- ✓ Extracción sanguínea a los 15, 30, 60 y 90' para la determinación de FSH y LH.

Los métodos de medición de LH, FSH, testosterona, inhibina B, 17-B-estradiol y su descripción se recogen en la tabla 7.

Técnica	Método	Casa Comercial	Límite inferior de detección
LH	Inmunoquimioluminiscencia directa	Siemens/CENTAUR	0,07 UI/L
FSH	Inmunoquimioluminiscencia directa	Siemens/CENTAUR	0,3 UI/L
17-B-estradiol	Inmunoquimioluminiscencia directa	Siemens/CENTAUR	10 pg/ml
Testosterona	Inmunoquimioluminiscencia directa	Siemens/CENTAUR	0,05 ng/ml
Inhibina B	Enzimoinmunoensayo	Beckman Coulter	3 pg/ml

Tabla 7. Resumen de las técnicas de medición de las hormonas, fundamento y límite inferior de detección.

## 5. Estudios genéticos

### 5.1) Protocolo obtención de ADN

En ambos grupos se obtuvo 3 ml de sangre total en tubo con anticoagulante Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) del *probandus*. En el grupo PPCI se extrajo además muestra de ambos progenitores y, en los casos familiares, del familiar afecto de PPCI. Las muestras fueron agrupadas por familias.

Se utilizaron dos métodos de extracción de ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica, automatizados y validados en el servicio de Genética de la Fundación Jiménez Díaz que ofrecen una concentración y pureza adecuados para la realización de estudios moleculares:



- Extractor de ADN automático MagNA Pure Compact de Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, y kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (136), a partir de 1 ml de sangre total.
- Extractor de ADN automático EZ1 Advanced XL de QIAGEN, Hilden, Germany, y kit EZ1® DNA Blood Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante(137), a partir de 350 ul de sangre total.

La concentración de ADN y su pureza fueron evaluadas usando el método fluorimétrico Qubit de Thermo Fisher Scientific.

## 5.2) Diseño de estudios genéticos.

El protocolo que se utilizó para la realización de los estudios genéticos fue diferente para los dos grupos incluidos, es decir para el grupo de pacientes con PPCI y para el grupo de pacientes con HHPc.

A continuación, se describen las técnicas realizadas en general y luego se describirá el algoritmo de trabajo para cada grupo.

### 5.2.1) *Secuenciación de Nueva Generación (NGS).*

**5.2.1.1) Kit True Sight One (TSO):** se procedió a la preparación de las muestras y construcción de las librerías usando el kit *True Sight One* de Illumina para la captura del exoma clínico que incluye 4813 genes, siguiendo protocolos validados.

**5.2.1.2) Kit Clinical Exome Solution (CES):** se procedió a la preparación de las muestras y construcción de las librerías usando el kit *Clinical Exome Solution\_v.2* de Sophia Genetics, kit que incluye 4493 genes. La preparación de las muestras y construcción de librerías se realizó siguiendo protocolos validados.

Una vez obtenidas las librerías, éstas fueron normalizadas y mezcladas en un *pool* que fue introducido para su secuenciación en un sistema NextSeq 500 (Illumina).

**5.2.1.3) Análisis bioinformático:** se realizó mediante tres plataformas:

- ✓ *BaseSpace Sequence Hub*, entorno de *Cloud Computing* de Illumina

- ✓ Plataforma DDM SOPHIA® de SOPHIA Genetics.
- ✓ *Pipeline* diseñado por el Departamento de Bioinformática de la Fundación Jiménez Díaz.

El análisis de las variantes se realizó con el programa VariantStudio.2.2 y con el programa DDM de SOPHIA Genetics. Los parámetros de calidad que debían cumplir las muestras fueron: cobertura de las regiones diana al 20x mayor a 60%. Las variantes encontradas debían estar cubiertas por al menos 20 lecturas y con una frecuencia de al menos 30%, sólo se tomaron en cuenta las variantes que se encontraban en la región intrónica a +/- 10 nucleótidos del inicio o final del exón. Todas las variantes fueron analizadas y clasificadas siguiendo las recomendaciones del Colegio Americano de Genética Médica ACMG(131), ver tabla 8.

<b>Clase 1</b>	<b>Benigna</b>
<b>Clase 2</b>	<b>Probablemente Benigna</b>
<b>Clase 3</b>	<b>Variante de significado clínico incierto (VUS)</b>
<b>Clase 4</b>	<b>Probablemente patogénica</b>
<b>Clase 5</b>	<b>Patogénica</b>

Tabla 8. Clasificación de las variantes según los criterios de la ACMG, extraído de *Richards et al* (131).

### 5.2.2) Secuenciación Sanger.

- ✓ Para la secuenciación de las regiones de interés se procedió a la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizando el diseño de las parejas de cebadores con la herramienta informática de libre acceso UCSC In-Silico PCR de la Universidad de California Santa Clara (138), el diseño de parejas de cebadores y las condiciones de la PCR se recogen la tabla 9.
- ✓ Se realizó la PCR siguiendo los siguientes pasos: a 2 µl de ADN genómico se le agregó la mezcla formada por tampón enriquecido con cloruro de magnesio, desoxinucleótidos (dNTPs) a una concentración de 1,25mM, cebadores a una concentración de 10pmol/µl, enzima Taq polimerasa® y agua hasta un volumen de 50 µl. Las proporciones de cada experimento se recogen en la tabla 10. Las condiciones para cada PCR se recogen en la tabla 11a, se programaron en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA).
- ✓ Se testaron 5 µl del producto amplificado por PCR en un gel de agarosa al 3% en tampón de TBX al 10x mediante electroforesis, comprobando que el tamaño

correspondía con el esperado y se evidenció la ausencia de amplificación en el pocillo correspondiente al blanco. Se ajustaron las condiciones de la PCR para evitar las bandas inespecíficas o ausencia de amplificación.

- ✓ Purificación mediante el kit E.Z.N.A® Cycle-Pure (Omega-Biotech), siguiendo las recomendaciones del fabricante.
- ✓ Reacción de secuenciación utilizando el kit ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystem que incorpora como reactivos: dNTPs (90%), ddNTPs (10%), tampón de la Taq polimerasa a 1X con 15mM de MgCl<sub>2</sub> y 1U de AmpliTaq Gold polimerasa. La mezcla de cada experimento es común a todos los amplicones y contenía: 3μ de la mezcla del kit ABI PRISM® BigDye®, 0,5μ del cebador en sentido *forward* o en sentido *reverse*, 5μ del producto de la PCR purificado y agua suficiente para obtener un volumen final de 20 μl.
- ✓ Las condiciones de la PCR, también comunes para todos los amplicones, se recogen en la tabla 11b, se programaron en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, C.A. USA) y son comunes para todos los fragmentos analizados.
- ✓ Purificación de la reacción de secuenciación, se llevó a cabo mediante el empleo de las columnas de SEPHADEX siguiendo las indicaciones del fabricante.
- ✓ El volumen total obtenido en el paso anterior se mezcló con 20 ul de formamida ultra pura.
- ✓ Se realizó electroforesis capilar con esta mezcla en un analizador 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y se analizaron posteriormente, con el programa informático Sequencing Analysis v.5.2 comparando con la secuencia de referencia para cada región.

Gen	Secuencia de Referencia	Ubicación	Cebadores	Temperatura de alineamiento	Tamaño del amplicón
KISS1	NM_002256	Exón 2	F: 5`-TGCCTGACCTAGTCTTTGTT-3` R: 5`-TTGTTGCAAAATGAGCTTTC-3`	56°C	240 pb
		Exón 3 y región 3`UTR	F: 5`-CCTAGGGCCTAATCATCCA-3` R: 5`-CTTCCAACCCGAGGCAAT-3`	61°C	606 pb
MKRN3	NM_005664.3	Región promotora	F: 5`-CTGCCATGAATTAAACCAGTAGA-3` R: 5`-TGTGTGTTCTCTACTTCCG-3`	59°C	710 pb
		Exón único A	F: 5`-TATGTCAGATTGGAAAATTGC-3` R: 5`-GATCTGCTTTGTCCAAATG-3`	57°C	555 pb
		Exón único B	F: 5`-ATCTGCTGCTCCAGATTCA-3` R: 5`-TAATAGCAAAACCGCAACC-3`	57°C	618 pb
		Exón único C	F: 5`-GGATGCCATTGAGTTTGTT-3` R: 5`-CTTCCGCAAAATACCTGC-3`	57°C	614 pb
		Exón único D	F: 5`-CCAGACAGTTTGAGAACAGG-3` R: 5`-GGAAAGATATGCAGAATAGACAA-3`	57°C	617 pb
		Exón único E	F: 5`-TGTGTTGACACTCTTACTGCTT-3` R: 5`-TGTTAGGCTTTGACCTTCAG-3`	57°C	674 pb
TACR3	NM_001059.2	Exón 5	F: 5`-TGTCTTTTCATCAAGTTT-3` R: 5`-GTCACATTTATACACTACCTTT-3`	50°C	439 pb
DLK1	NM_001317172	Exón 1	F: 5`-CAACCAGAAGCCAGTGC-3` R: 5`-GTTGGGGCTCACGAGACG-3`	62°C	247 pb
		Exón 2	F: 5`-CCTGGTGGGGTGAATTGTAT-3` R: 5`-TTTTCTGCCTGACTTCACGA-3`	60°C	179 pb
		Exón 3	F: 5`-CCTGCCCTCTTCATATGTCC-3` R: 5`-AGGTAAGGACGCAGAGCTGA-3`	60°C	220 pb
		Exón 4	F: 5`-CATCACGCTCGTGTATGGA-3` R: 5`-AGGATGAGCGCTTACTTCATC-3`	60°C	320 pb
		Exón 5	F: 5`-CCTGAGGCCGTTTACTATGTC-3` R: 5`-TCTGCGGAACCTCAAGAATC-3`	60°C	828 pb
SOX10	NM_006941	Exón 4	F: 5`-CCGACTCATGCTGCCAAAT-3` R: 5`-GAGGTGTAGGCGATCTGTGA-3`	45°C	596 pb
NSMF	NM_001130969	Exón 9	F: 5`-GCGGCGACCTCTGTATGG-3` R: 5`-GAGAAGGCTGCGTGGTCC-3`	60°C	362 pb
FGFR1	NM_001174063	Exón 9	F: 5`-TTGCCTGATCCTCCTAGTGC-3` R: 5`-GTGATATGGAGGTGCAGGA-3`	62°C	578 pb

Tabla 9. Fragmentos o exones amplificados cebadores y temperatura de alineamiento

# PACIENTES Y MÉTODOS

Gen	Exón	Tampón (μl)	dNTP (μl)	Cebador F (μl)	Cebador R (μl)	GC Rich (μl)	Enzima (μl)	ADN (μl)	Agua (μl)
KISS1	2	5	8	2	2	10	0,5	2	hasta 50
	3								
MKRN3	promotor	5	8	2	2	-	0,5		
	A								
	B								
	C								
	D								
	E								
TACR3	5	5	8	2	2	5	0,5		
DLK1	1	5	8	3	3	5	0,5		
	2			2	2				
	3								
	4								
	5								
SOX10	4	5	8	2	2	10	0,4		
NSMF	9	5	8	2	2	10			
FGFR1	9	5	8	2	2	-			

Tabla 10. Cantidades y proporciones de los reactivos y ADN utilizado en cada reacción de PCR.

Gen	Exón	Desnaturalización		Ciclos de amplificación							Elongación final	
				Desnaturalización		Hibridación		Elongación		número de ciclos		
		Temperatura °C	Tiempo min	°C	Tiempo seg	°C	Tiempo seg	°C	Tiempo seg			
KISS1	2	95	10	95	30	56	45	72	45	35	72	10
	3					61						
MKRN3	promotor	95	7	95	30	59	45	72	45	35	72	10
	A					57						
	B											
	C											
	D											
	E											
TACR3	5	95	7	95	30	65	45	72	45	35	72	10
DLK1	1	95	7	95	30	62	30	72	30	35	72	10
	2					60	45		45			
	3											
	4											
	5											
SOX10	4	95	5	95	20	60	10	72	45	40	72	10
NSMF	9	95	5	95	20	60	20	72	45	40	72	10
FGFR1	9	95	5	95	20	62	10	72	45	40	72	10

Tabla 11a. Ciclos y temperaturas utilizados para cada fragmento amplificado.

Desnaturalización		Ciclos de amplificación						número de ciclos
		Desnaturalización		Hibridación		Elongación		
Temperatura °C	Tiempo min	°C	Tiempo seg	°C	Tiempo seg	°C	Tiempo seg	
94	3	50	5	50	5	60	4	25

Tabla 11b. Ciclos y temperaturas utilizados para la reacción de secuenciación.

### 5.2.3) Estudios para detectar cambios de número de copia.

#### 5.2.3.1) La amplificación de sonda dependiente de la ligadura múltiplex (MLPA) (MRC-Holland)

Esta técnica permite la evaluación de cambios de número de copia (deleciones o duplicaciones) (CNVs) de diferentes regiones genómicas. Consiste en una variación de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple que permite la amplificación de múltiples regiones con un solo par de cebadores de forma simultánea. Se usaron los kits comerciales de MRC Holland SALSA ME-028 para evaluar deleciones/duplicaciones del gen *MKRN3* y ME-032 para descartar deleciones/duplicaciones en exones 3 y 4 de *DLK1*. Estos kits también discriminan el estado de metilación del centro de impronta correspondiente. Por lo que se usó como para detectar patrones de metilación aberrante en el gen *DLK1* que pudiesen presentarse en la Disomía uniparental materna del cromosoma 14.

- ✓ Se mezcló 1,5 µl del ADN problema con tampón 3,5 µl del tampón TE [mezcla de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)] y se desnaturalizó el ADN llevándolo a una temperatura de 98°C durante 5 minutos.
- ✓ A continuación, se agregó a la mezcla anterior: 0,75 µl de tampón de hibridación (facilitado en el kit comercial) y 0,75 µl de la sonda específica del kit. Cada sonda consiste en dos oligonucleótidos que reconocen secuencias en la región problema ubicadas de forma adyacente, cada uno de los oligonucleótidos contiene la secuencia para ser reconocido por el cebador en sentido *forward* o *reverse*. Esta mezcla se llevó a 95°C (para la desnaturalización del ADN) y se dejó hibridando a una temperatura de 60°C durante 16 horas.
- ✓ Se preparó una mezcla de 3 µl de tampón A con 10 µl de agua y se agregó a la mezcla anterior, a temperatura ambiente.

- ✓ Como se utilizaron kits de discriminación del estado de metilación, el segundo paso fue dividir el volumen obtenido del paso anterior en dos muestras. Una de las muestras fue digerida con 0,5 µl de la enzima de restricción recomendada *HhaI* (como se describe en el siguiente apartado), que reconoce la secuencia 5`GCG|C3` y realiza el corte entre la guanina y citosina en 3era y 4ta posición. Por lo que, si las citosinas se encuentran metiladas, no serán reconocidas por la enzima y la digestión no se llevará a cabo. El diseño de algunas sondas de estos kits comerciales incluye algunas de las regiones reconocidas por la enzima.
- ✓ A cada una de las muestras se le agregó una mezcla que contenía: 1,5 µl de tampón B, 0,25 µl de enzima ligasa, a la muestra que sería digerida con la enzima *HhaI* se le agregó 0,5 µl de la misma, y agua hasta completar 10 µl. Esta mezcla se agregó a las muestras a 48°C de temperatura y se dejó incubar durante 30 minutos. Éste es el paso limitante de la reacción, consistió en el ligamiento de los dos oligonucleótidos que hibridan en las respectivas secuencias problema.
- ✓ Posteriormente, se realizó una PCR con cebadores universales, utilizando: 1 µl de cebadores y 0,25 µl de polimerasa. El cebador en sentido *forward* se encuentra marcado con un fluorocromo FAM.
- ✓ Cada sonda completa posee un tamaño característico para cada kit por lo que los amplicones pueden ser separados e identificados por electroforesis capilar.
- ✓ Los resultados se interpretaron comparando las áreas normalizadas de los picos de cada tamaño en cada muestra con el área normalizada en las muestras de referencia, la relación obtenida debía estar alrededor de 1 (0,8-1,3), una relación < 0,65 y > 0,4 era compatible con una delección heterocigota, una relación < 0,4 era compatible con una delección homocigota; una relación > 1,3 y < 1,65 era compatible con una duplicación heterocigota y por último, una relación >1,65 era compatible con una duplicación homocigota. Para la evaluación del estado de metilación de las regiones donde hibridan las sondas reconocidas por la enzima, se comparan las áreas normalizadas de las muestras con y sin enzima de restricción y se mide la disminución de la señal esperada, siguiendo el patrón recomendado para cada sonda (139).

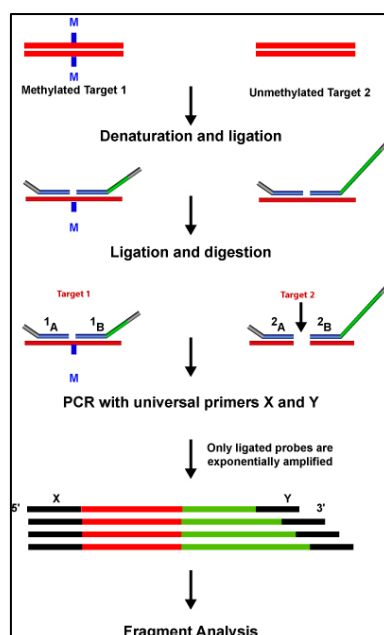


Figura 11. Pasos de la técnica de ME-MLPA

#### 5.2.3.2) PCR digital

La PCR digital es una técnica de PCR cuantitativa, que permite la cuantificación absoluta de los fragmentos de ADN diana presentes en una muestra. Se basa en la partición la muestra en múltiples “espacios” (que pueden ser gotas o pocillos) que se comportarán como reacciones independientes, esto ocasiona que en algunos espacios habrá una o algunas moléculas de nuestro ADN problemas y en otras no habrá ninguna copia. En cada espacio se llevará a cabo la reacción de PCR, donde uno de los cebadores estará marcado con fluorescencia detectable por el analizador. Una vez terminados los ciclos de PCR programados, la cuantificación se realiza midiendo la fluorescencia emitida en cada uno de los espacios de la partición de forma binaria, es decir presente o ausente; los espacios con detección de fluorescencia se conocen como eventos. Posteriormente estos datos se utilizan para un cálculo matemático que permite la cuantificación del ADN diana y se compara con la concentración de ADN para el ensayo donde se utilizaron cebadores para un gen control. Es una técnica que permite la cuantificación de número de copias al comparar la cantidad de eventos correspondiente a la amplificación de la región problema con la cantidad de eventos correspondientes a la amplificación de una región control, pueden utilizarse diversas aproximaciones estadísticas para esta comparación, en todas ellas se llegará a una relación de cantidad de dosis del gen problema con respecto al gen control (140).



En nuestro caso se utilizó esta técnica para determinar la presencia de una deleción o duplicación en el exón 3 del gen *KISS1* en una familia del grupo PPCI, para ello se usó la sonda comercial Taqman® para análisis de CNVs con el número de identificación: Hs00837039\_cn. El experimento se realizó en un sistema QX200 de BioRad (Hercules, California-USA), y se utilizó como control una sonda dirigida al gen *RNASE6*, siguiendo protocolos validados.

#### 5.2.4) Estudio de la Disomía Uniparental Materna del cromosoma 14, citobanda 14q32.2

Se realizó el análisis de fragmentos obtenidos mediante amplificación de regiones microsatélites o *Short Tandem Repeats (STRs)*, se eligieron los STRs para evaluar la región alrededor del gen *DLK1*, causante de PPCI. En la tabla 12 se muestran los marcadores y fluorocromos empleados, la distancia en Mb hasta *DLK1*, los tamaños esperados y condiciones de amplificación utilizadas. Para la reacción se utilizó una premezcla liofilizada en tubos individuales a los que se le añadía el ADN, agua suficiente para un volumen final de 25 µl en una misma reacción se amplificaron los microsatélites D14S1426 y D14S1006 y en otra los microsatélites D14S250, D14S78 y D14S985, la cantidad de cebador se indica en la tabla 13, así como el resto de las cantidades de reactivos y ADN utilizado. Además, el estudio por técnica de ME-MLPA descrito en el apartado anterior, permite detectar patrones de metilación aberrante en los genes *DLK1*, *MEG3* y *MIR380* ubicados en la región improntada del cromosoma 14, por lo que la presencia de una disomía uniparental daría como resultado un patrón de metilación alterado y por lo tanto detectable con dicha técnica.

Cromosoma	Citobanda/gen	Fluorocromo	Microsatélite	coordenada de inicio	coordenada final	Distancia (Mb)	Fracción de heterocigocidad
14	14q32.2 <i>CCDC85C</i>	FAM	D14S250	99,991,917	99,992,019	0.734808	0.67
	14q32.2 <i>CCDC85C</i>	FAM	D14S78	100,005,460	100,005,688	0.721139	0.67
	14q32.2 <i>CYP46A1</i>	VIC	D14S1426	100,153,228	100,153,379	0.573448	0.78
	14q32.2 <i>YY1</i>	FAM	D14S1006	100,713,274	100,713,404	0.013423	0.75
	14q32.2 <i>DLK1</i>			100,726,827	100,738,224		
	14q32.2 <i>WARS</i>	VIC	D14S985	100,830,273	100,830,408	0.092049	0.76

Tabla 12. Listado de STRs estudiados, localización fluorocromo marcador, distancia en Mb a *DLK1*, fracción de heterocigocidad.

Microsatélite	Cebador F (μl)	Cebador R (μl)	ADN (μl)	Agua (μl)
D14S250	0,5	0,5	1	Hasta 25μl
D14S78	1	1		
D14S985	0,75	0,75		
D14S1426	0,25	0,25	1	Hasta 25μl
D14S1006	1,5	1,5		

Tabla 13. Cantidad de cebador, ADN y necesaria para la PCR. Se utilizaron tubos de 0,2 ml con premezcla de tampón y enzima liofilizados.

A continuación, se detalla el procedimiento específico que se siguió con cada grupo de muestras:

## 6. Grupo PPCI

El estudio de estos pacientes se dividió en dos periodos. Se recoge el flujograma de ambos en grupos en la figura 9. Inicialmente, se planteó la realización de estudio del exoma clínico con el kit TSO, el análisis bioinformático se realizó en el *BaseSpace Sequence Hub*, entorno de Cloud Computing de Illumina, en la plataforma DDM SOPHIA® de SOPHIA Genetics y mediante el *pipeline* diseñado por el Departamento de Bioinformática de la Fundación Jiménez Díaz. El análisis de las variantes se realizó en los programas VariantStudio.2.2 de Illumina y DDM de SOPHIA Genetics DDM. El primer filtrado se realizó por ocho genes relacionados con la síntesis y liberación de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH):

- *KISS1* (NM\_002256.3), *KISS1R* (NM\_005664.3), *TAC3* (NM\_013251.3), *TACR3* (NM\_001059.2), *MKRN3* (NM\_005664.3), *GNRHR* (NM\_000406), *LIN28B* (NM\_001004317), *GNRH1* (NM\_000825).

Tras este filtrado de ocho genes, se procedió a buscar una nueva lista de candidatos. De esta forma, con la ayuda del departamento de bioinformática, se utilizó un mecanismo de selección que evaluó tres características, denominadas “canales”:

1. Genes implicados en tres vías: vía de señalización dependiente de Calcio, interacción ligando neuroactivo-receptor y vía reguladora de GnRH.
2. Genes que interaccionan en la base de datos STRING (<http://string-db.org/>) con los ocho genes del primer filtrado. STRING es una base de datos de interacciones proteína-proteína conocidos. Estas interacciones incluyen: interacciones físicas o directas, o interacciones funcionales o indirectas (141).
3. Se buscaron las anotaciones de *Human Phenotype Ontology* (HPO) (142) de los ocho genes del primer filtrado, y se añadieron los genes que aparecían en estas anotaciones. El HPO es un mecanismo de anotación estandarizada del vocabulario utilizado en la

descripción de las alteraciones fenotípicas, donde cada término describe una alteración y sus sinónimos. También ofrece información acerca de los genes y enfermedades relacionados con la alteración fenotípica.

Con toda esta información se construyó un archivo en documento Excel donde a cada gen se le asignó una puntuación (1, 2 ó 3) dependiendo de si habían sido elegidos por uno, dos o los tres canales (vías, interacciones o fenotipos). Si la puntuación equivalía a 3 puntos era porque dicho gen aparecía en los tres canales, una puntuación de 2 es que sólo ha aparecido en dos (cualquiera de ellos).

Con este método se obtuvo un listado de 851 genes. Seguidamente, se descartaron los genes que solo tenían puntuación de 1 punto, con lo que se obtuvo una lista compuesta por 101 genes. Finalmente, de éstos se escogieron ocho genes que efectivamente estaban relacionados con la señalización de GnRH, no estaban asociados a patología sindrómica o pubertad precoz que no fuese de origen central y estaban incluidos en el kit de captura utilizado. Los genes elegidos mediante este método fueron: *PROKR2* (NM\_144773.3), *FSHB* (NM\_000510.2), *LHB* (NM\_000894), *FSHR* (NM\_000145), *GHRL* (NM\_001134941), *ADIPOQ* (NM\_001177800), *ADIPOR1* (NM\_015999), *PDYN* (NM\_001190892).

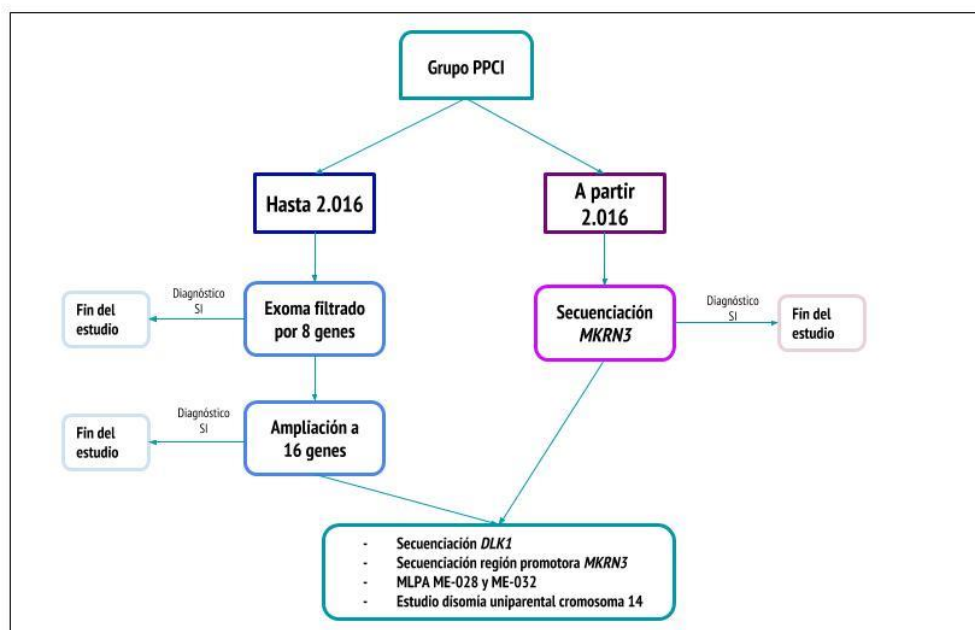


Figura 12. Algoritmo de trabajo para el grupo PPCI.

Se utilizó la técnica de secuenciación Sanger descrita en el apartado 5.2.2 para la comprobación de las variantes obtenidas mediante la secuenciación masiva que fueron clasificadas como clase 4 o clase 5, siguiendo los criterios recomendados por la ACMG (131), así como para la búsqueda de dichas variantes en los progenitores y familiares de

los *probandus*. Se utilizó esta técnica para estudiar la región 3'UTR del gen *KISS1* en búsqueda de los polimorfismos descritos por *Huijbregts y colaboradores* (70) en el grupo de *probandus* y controles para evaluar si existía alguna diferencia en la frecuencia de aparición en uno y otro grupo.

En la tabla 9 se recogen los fragmentos o exones amplificado, los cebadores y condiciones utilizados. En la tabla 10 se recogen las condiciones de la PCR.

En octubre 2016 se decidió modificar el protocolo de abordaje, ver figura 12. De tal manera que el estudio de los pacientes con PPCI comenzase con el análisis del gen *MKRN3* utilizando la técnica de secuenciación Sanger descrita en el apartado 5.2.2. Se estudió el único exón de este gen mediante 5 fragmentos solapantes denominados A, B, C, D y E (tabla 9 y 10).

En aquellos pacientes con resultado negativo pertenecientes a ambos grupos se les realizó de manera secuencial los siguientes estudios:

- Estudio de la región promotora de *MKRN3* utilizando secuenciación Sanger. La región promotora del gen *MKRN3* (NM\_005664.3) se estudió con el diseño de los cebadores recogido en la tabla 9. Se siguió el protocolo descrito en el apartado 5.2.2. El electroferograma obtenido se comparó con la secuencia de referencia NM\_005664.3.
- Estudio de la región codificante de *DLK1* utilizando secuenciación Sanger. Este gen no está incluido en el kit de captura del exoma clínico. La región exónica del gen *DLK1* se encuentra organizada en 5 exones. El diseño de los fragmentos se realizó de tal manera que se abarcara la totalidad de cada exón y la región canónica de *splicing* (ver tabla 9 y 10). Se siguió el protocolo descrito en el apartado 5.2.2. El electroferograma obtenido se comparó con la secuencia de referencia NM\_001317172.
- Para el análisis del número de copia en los genes *MKRN3* y *DLK1* se utilizó la técnica de MLPA, se siguió el protocolo descrito en el apartado 5.2.3. Este abordaje tiene las siguientes limitaciones: Para el análisis de *MKRN3* con el kit comercial de MLPA (MRC Holland) SALSA ME-028-C1. Este kit tiene sólo una sonda localizada en NM\_005664.3: c.1296-1297. Por lo que deleciones ubicadas en otra región del gen no son susceptibles de ser detectadas. Para el análisis de *DLK1* con el kit comercial de MLPA (MRC Holland) SALSA ME032-A1. Este kit tiene 2 sondas, una localizada en el exón 3 y otra en el exón 4, por lo que deleciones o duplicaciones ubicadas en otra región no pueden ser evaluadas.

- En la familia 11 se realizó el análisis de número de copia del exón 3 de *KISS1* mediante el estudio análisis por PCR digital utilizando la sonda Taqman® Hs00837039\_cn, siguiendo protocolos validados.
- Estudio de la Disomía Uniparental Materna del cromosoma 14, citobanda 14q32.2 se realizó mediante el análisis de fragmentos obtenidos por amplificación regiones microsatélites o STRs, y con la técnica de MLPA utilizando el kit comercial de MLPA (MRC Holland) SALSA ME032-A1 para la detección de un patrón de metilación aberrante de los genes ubicados en la región improntada del cromosoma 14. El listado de STRs se recoge en la tabla 12. Siguiendo pasos descritos en los apartados 5.2.4 y 5.2.3.1, respectivamente.

## 7. Grupo HHPc

Los pacientes con HHC fueron analizados usando la técnica de secuenciación masiva de exoma, utilizando el kit de captura CES v2. El análisis bioinformático se realizó mediante la plataforma DDM SOPHiA® de SOPHiA Genetics. El análisis de las variantes se realizó en el programa DDM de SOPHiA Genetics, el kit de captura y pipeline informático de este kit comercial permite una cobertura homogénea por lo que su algoritmo bioinformático es capaz de hacer un análisis de la presencia de cambios de número de copia (deleciones/duplicaciones) de los exones de los genes estudiados, este análisis mejora conforme el gen tenga mayor cantidad de genes, por lo que en genes con tres exones o menos esta estimación no es óptima. Se diseñó un panel de genes relacionados con HHPc con y sin anosmia asociada (6-8,109-111,118,121,122,129). El flujograma de análisis fue el siguiente:

- 1) Si el paciente presentaba obesidad mórbida o de inicio precoz se incluía en el análisis a los genes *LEP* (NM\_00230.2), *LEPR* (NM\_002303) y *PCSK1* (NM\_000439).
- 2) Si el paciente era varón con insuficiencia suprarrenal primaria se incluía al gen *NROB1* (*DAX1*).
- 3) Si había sospecha de síndrome de Kallmann (HHPc más anosmia/hiposmia), se incluía además algunos genes relacionados con patología sindrómica, se analizaba en primera instancia los genes: *ANOS1* (NM\_000216), *AXL* (NM\_001699), *CHD7* (NM\_017780), *FGF8* (NM\_033163.3), *FGFR1* (NM\_023110.2), *HESX1* (NM\_003865), *NSMF* (*NELF*) (NM\_001130969), *PNPLA6* (NM\_006702), *POLR3B* (NM\_018082.5), *PROK2* (NM\_001126128.1), *PROKR2* (NM\_144773), *SEMA3A* (NM\_006080), *SEMA3E* (NM\_001178129), *SEMA7A* (NM\_003612.4), *SMCHD1* (NM\_015295.2), *SOX10*

(NM\_006941), *SPRY4* (NM\_030964.3), *WDR11* (NM\_018117.11), *RAB18* (NM\_021252.4), *RAB3GAP1* (NM\_012233), *RAB3GAP2* (NM\_012414.3).

- 4) Si el paciente tenía HHPc sin anosmia se analizaba en primera instancia los genes *GNRH1*(NM\_000825), *GNRHR* (NM\_000406.2), *KISS1* (NM\_002256), *KISS1R* (NM\_032551), *TAC3* (NM\_013251.3), *TACR3* (NM\_001059), *FSHB* (NM\_000510.2), *LHB* (NM\_000894.2).
- 5) En los pacientes con sospecha de síndrome Kallmann con resultado negativo se ampliaba el análisis al grupo de genes no relacionados con anosmia y, viceversa.

Se utilizó la técnica de secuenciación Sanger descrita en el apartado 5.2.2 para la comprobación de las variantes obtenidas mediante la secuenciación masiva que fueron clasificadas como clase 4 o clase 5, siguiendo los criterios recomendados por la ACMG (131). Las variantes testadas se describirán en el apartado de resultados; su localización, el fragmento o exón amplificado, los cebadores y condiciones utilizados se recogen en la tabla 8.

## 8. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron usando el entorno R para análisis estadísticos (143), con el uso del paquete Rcmdr, versión 2.4-4 (144). Los datos numéricos se expresaron en media con intervalo de confianza del 95%, siempre y cuando tuviesen una distribución normal, que fue evaluada con la prueba de Shapiro-Wilk. Cuando los datos no seguían una distribución normal se expresaron como mediana y rango intercuartílico. La comparación de frecuencias de polimorfismos en la región 3'UTR del gen *KISS1* entre el grupo control y el grupo PPCI se realizó calculando *odds ratio* utilizando un intervalo de confianza de 95%. Los datos categóricos se expresaron como porcentaje.

## 9.- Aspectos éticos.

El presente estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz (ver anexo 1), y ha sido realizado siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki.

Tras explicar a los representantes legales de los participantes la naturaleza del estudio y los procedimientos a seguir, éstos firmaron el correspondiente consentimiento informado ver anexo 2. Los participantes no recibieron compensación monetaria para participar en el presente estudio. El resguardo y destino final de las muestras obtenidas fue el Biobanco del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.

## Resultados

Los resultados se presentarán en dos grupos: grupo PPCI y grupo HHPc.

## 1. Grupo PPCI

### 1.1 Descripción de la cohorte

Este grupo estaba compuesto por 31 pacientes no emparentados. El 93,5% de los individuos (29 de 31) pertenece al sexo femenino, La distribución étnica fue la siguiente: caucásica 61,3%, latinoamericana 22,6%, asiática 9,7%, gitana y africana 3,2%.

De los 31 pacientes incluidos, 12 presentaban antecedentes familiares de pubertad precoz, lo que representa 38,7%.

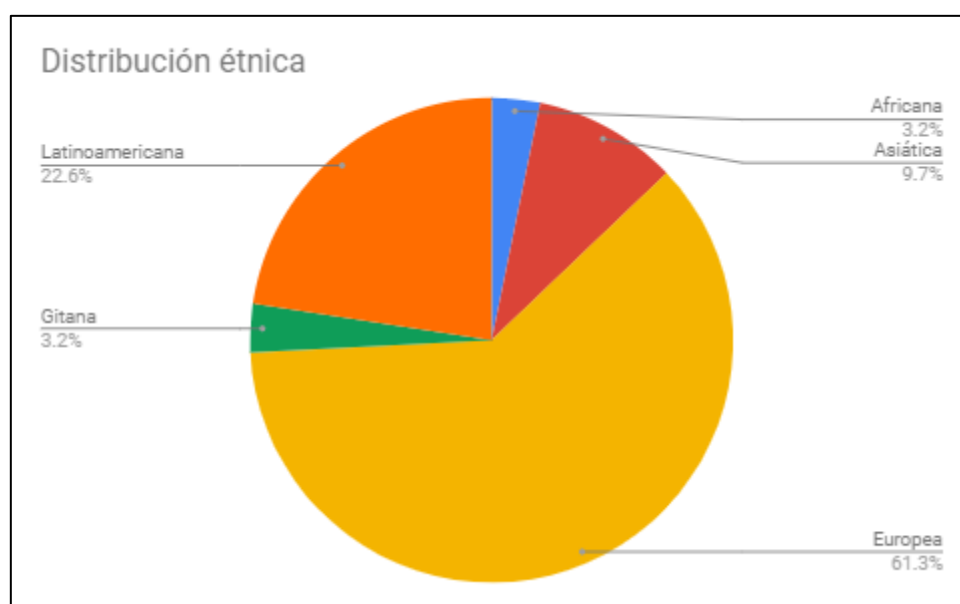


Figura 13. Distribución étnica de los pacientes con PPCI.

La mediana del peso al nacimiento expresado en SDS fue de -0,42 [primer cuartil (QI) de la distribución fue de -1,24 y el tercer cuartil (QIII) estuvo ubicado en -0,01].

La mediana de la edad al inicio de los síntomas en las niñas fue de 7,16 años (QI= 6,25 y QIII= 7,5), los dos pacientes de sexo masculino presentes en nuestra serie iniciaron la sintomatología a los 5 años y a los 7 años, respectivamente. La mediana de la edad al diagnóstico en las niñas fue de 7,75 años (QI =7,25 y QIII=7,91), en los dos niños fue de 6,16 y 8,66 años respectivamente. La mediana del tiempo medido en años entre el inicio de síntomas y el diagnóstico fue de 0,66 años en las niñas (QI=0,33 años y el QIII=0,91 años).



La media de la edad ósea fue de 8,70 años con un intervalo de confianza 95% (IC95) de 8,09-9,31 años. Todos los pacientes presentaban adelanto de la edad ósea, siendo la media de este adelanto 1,58 años (IC95: 1,22-1,95). Datos que se muestran en la tabla 16.

La media de la talla al diagnóstico fue de +1,79 SDS (IC95: +1,27 a +2,31). La talla genética media de los pacientes incluidos en el estudio fue de -0,08 SDS (IC95: -0,41 a +0,25). Datos que se muestran en la tabla 14. La media de la velocidad de crecimiento fue de +3,86 SDS (IC95: +3,08 a +4,65). Por otra parte, la media del índice de masa corporal (IMC) al diagnóstico fue de +0,65 SDS (IC95: +0,24 a +1,06). Datos que se muestran en la tabla 14.

En cuanto a la talla de los progenitores, edad de la menarquia para las madres y descripción del primer afeitado (adelantado, normal o tardío) se resumen en la tabla 14. En cuanto a la edad de primer afeitado de los padres, sólo 20 de los 31 padres (65%) pudieron precisar la edad aproximada de su primer afeitado, refiriéndolo como normal en el 85% (n=17) de los casos, como tardío en el 10% (n=2) y como temprano en el 5% (n=1).

El estadio Tanner de cada uno de los pacientes está recogido en la tabla 15.

## 1.2 Estudios hormonales

El resumen de los valores de LH y FSH basal y el pico de ambos durante la prueba de LHRH, los valores de estradiol y testosterona están recogidos en la tabla 16.

## RESULTADOS

Tabla 14. Resumen de la IMC, talla al diagnóstico en SDS y talla genética en SDS; talla de la madre y padre en cm y SDS, la edad de menarquia y edad de primer afeitado de los progenitores de los pacientes con PPCI.

Paciente	Sexo	IMC Dx (SDS)	Talla al diagnóstico (SDS)	talla genética (SDS)	Talla madre (cm)	Talla madre (SDS)	Edad de la menarquia madre	Talla padre (cm)	Talla padre (SDS)	Edad del primer afeitado
15/0136	Fem	1,84	2,63	-0,22	167	1,00	11,5	166	-1,59	normal
14/2004	Masc	0,50	2,80	1,31	174	2,23	13	180	0,73	temprano
15/0214	Fem	-0,10	2,36	1,09	170	1,53	9	178	0,40	ND
15/0368	Fem	-1,09	0,31	-1,27	156	-0,92	16	165	-1,75	ND
15/0441	Fem	0,50	0,49	0,04	155	-1,09	12,5	181	0,89	ND
15/0443	Fem	2,20	2,91	0,22	165	0,65	16	173	-0,43	ND
15/0562	Fem	-0,80	3,00	0,24	164,9	0,64	14	173,4	-0,36	ND
15/0565	Fem	1,84	1,76	-0,57	157	-0,74	10	172	-0,60	normal
15/0569	Fem	-0,63	1,09	0,65	177	2,75	14	166	-1,59	tardío
15/0572	Fem	0,07	0,87	-1,79	155	-1,09	11	160	-2,58	normal
15/0677	Fem	0,67	4,20	0,65	163	0,30	13	180	0,73	normal
15/0702	Fem	1,15	3,24	0,39	163	0,30	10	177	0,23	ND
15/0707	Fem	2,08	3,00	1,44	170	1,53	12	182	1,06	ND
15/0727	Fem	1,98	-0,67	-1,36	155	-1,09	9,75	165	-1,75	ND
15/0728	Fem	0,61	1,55	-0,05	163	0,30	11	172	-0,60	ND
15/0786	Fem	0,02	2,66	0,30	161	-0,05	12	178	0,40	normal
15/0791	Fem	1,00	2,50	-1,01	164	0,48	12,5	160	-2,58	normal
15/0937	Fem	1,39	1,07	-1,18	154	-1,27	15	168	-1,26	normal
15/0939	Fem	1,04	1,22	0,13	158	-0,57	14	179	0,56	normal
15/1069	Fem	0,63	1,90	-0,66	158	-0,57	12	170	-0,93	normal
15/1391	Fem	1,29	2,97	0,39	160	-0,22	10,83	180	0,73	ND
16/0030	Fem	0,73	3,10	0,30	159	-0,40	12	180	0,73	normal
16/0141	Fem	-0,77	-0,31	-0,92	158	-0,57	11	167	-1,42	normal
16/0155	Fem	-0,84	-0,37	ND	ND	-	11,5	168,2	-1,23	normal
16/2698	Fem	-1,21	-1,04	-0,48	150	-1,97	11	180	0,73	ND
16/2999	Fem	-0,31	0,83	-1,62	155	-1,09	14	162	-2,25	tardío
17/1706	Fem	0,57	1,35	0,13	160	-0,22	12	175	-0,10	normal
17/2169	Fem	-0,02	3,34	-1,36	158	-0,57	13	162	-2,25	normal
18/0052	Fem	1,08	4,39	1,44	165	0,65	11	187	1,89	normal
18/0693	Fem	0,99	2,11	0,30	159	-0,40	10	180	0,73	normal
18/1343	Masc	3,68	0,23	-0,51	160,5	-0,13	10	171,5	-0,68	normal

Fem: femenino, Masc: masculino. ND: dato no disponible.

Tabla 15. Estadio Tanner de cada uno de los pacientes del grupo PPCI.

Paciente	Sexo	Pubarquia	Axilarquia	Telarquia	Volumen Testicular D/I ml	Estadio puberal Tanner
15/0136	Fem	1	a	2		II
14/2004	Masc	2	a		8/6	II
15/0214	Fem	1	a	2		II
15/0368	Fem	1	a	2		II
15/0441	Fem	1	a	2		II
15/0443	Fem	2	a	2		II
15/0562	Fem	1	b	3		III
15/0565	Fem	1	a	1		II
15/0569	Fem	1	a	2		II
15/0572	Fem	2	b	1		II
15/0677	Fem	2	b	2		II
15/0702	Fem	2	b	3		III
15/0707	Fem	2	a	3		III
15/0727	Fem	1	a	3		III
15/0728	Fem	1	a	2		II
15/0786	Fem	1	a	3		III
15/0791	Fem	1	b	2		II
15/0937	Fem	2	a	2		II
15/0939	Fem	1	a	2		II
15/1069	Fem	1	a	2		II
15/1391	Fem	2	a	3		III
16/0030	Fem	1	b	3		III
16/0141	Fem	1	a	2		II
16/0155	Fem	1	a	1		II
16/2698	Fem	1	a	1		II
16/2999	Fem	1	a	2		II
17/1706	Fem	1	a	2		II
17/2169	Fem	1	a	2		II
18/0052	Fem	3	b	3		III
18/0693	Fem	2	b	2		II
18/1343	Masc	3	b		6/6	II

Fem: femenino. Masc: masculino

## RESULTADOS

Tabla 16. Se resume, la edad al diagnóstico, diferencia entre edad ósea (EO) y edad cronológica (EC), estadio puberal de Tanner (EP), valores basales y pico de LH, FSH, valores basales de testosterona y estradiol.

Paciente	Sexo	Edad al diagnóstico (años)	EO-EC (años)	EP	LH basal (UI/l)	Pico LH (UI/l)	FSH basal (UI/l)	Pico FSH (UI/l)	Testosterona (ng/ml)	17-beta-Estradiol (pg/ml)
15/0136	Fem	7,50	1,85	II	0,20	8,74	3,00	12,80	ND	19,40
14/2004	Masc	6,16	0,34	II	1,34	19,50	1,27	6,45	0,71	<10,00
15/0214	Fem	3,50	2,42	II	1,35	72,50	4,22	19,20	ND	43,77
15/0368	Fem	6,91	0,92	II	0,15	9,70	3,00	28,70	ND	ND
15/0441	Fem	6,91	1,08	II	0,48	9,90	2,80	18,00	ND	<10,00
15/0443	Fem	2,83	2,67	II	1,60	50,90	4,00	19,40	0,2	28,79
15/0562	Fem	7,75	1,25	III	0,91	37,99	3,71	28,51	ND	38,77
15/0565	Fem	6,33	2,50	II	1,20	10,50	9,60	13,00	ND	32,60
15/0569	Fem	7,75	0,30	II	0,20	8,70	6,00	15,50	ND	31,60
15/0572	Fem	7,66	0,00	II	0,28	19,70	3,75	20,50	ND	<10,00
15/0677	Fem	8,00	0,75	II	0,48	7,20	3,40	9,20	<0,05	26,55
15/0702	Fem	7,83	2,50	III	0,15	22,20	2,21	10,40	0,30	55,60
15/0707	Fem	3,33	1,92	III	2,20	98,00	6,90	35,00	ND	23,20
15/0727	Fem	9,58	1,17	III	0,41	19,20	2,83	12,24	ND	10,99
15/0728	Fem	7,91	0,50	II	0,23	7,83	5,85	29,00	0,06	12,80
15/0786	Fem	7,33	1,75	III	1,09	7,26	4,28	8,00	ND	26,00
15/0791	Fem	7,83	3,17	II	2,30	30,90	3,70	11,00	0,50	38,80
15/0937	Fem	8,58	3,17	II	0,07	5,30	1,13	13,20	<0,05	12,30
15/0939	Fem	7,50	1,00	II	0,56	8,50	4,00	10,98	ND	21,70
15/1069	Fem	7,25	1,25	II	<0,07	7,70	2,10	18,00	ND	<10,00
15/1391	Fem	7,91	2,59	III	1,17	10,50	6,27	12,30	ND	15,50
16/0030	Fem	7,25	4,25	III	2,95	48,37	5,53	17,12	0,25	42,00
16/0141	Fem	7,25	1,58	II	<0,07	8,62	2,02	16,84	<0,05	<10,00
16/0155	Fem	7,50	0,50	II	3,40	42,90	10,37	29,80	ND	<10,00
16/2698	Fem	7,75	0,75	II	0,46	7,80	6,40	22,60	ND	14,20
16/2999	Fem	7,75	1,25	II	1,45	10,26	6,50	10,00	ND	45,60
17/1706	Fem	8,00	0,83	II	2,30	23,00	6,00	15,00	ND	35,20
17/2169	Fem	7,50	0,83	II	2,00	30,60	5,20	22,40	ND	24,25
18/0052	Fem	8,66	2,25	III	2,78	ND	4,26	ND	ND	62,60
18/0693	Fem	7,92	1,66	II	0,20	13,30	2,20	10,40	0,10	<10,00
18/1343	Masc	8,66	2,00	II	2,40	8,00	ND	ND	170,00	ND

Fem: femenino, Masc: masculino, EC: edad cronológica, EO edad ósea. ND: dato no disponible.

## 1.3 Estudios genéticos

### 1.3.1 Secuenciación masiva

Se realizó el estudio de exoma clínico utilizando el kit de captura TSO de Illumina® en 20 *probandus*. Tras aplicar el primer filtrado de genes, utilizando el listado de los 8 genes: *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3*, *TACR3*, *MKRN3*, *GNRHR*, *LIN28B* y *GNRH1*, se obtuvo un resultado concluyente en una paciente, lo que representaba el 5%. Por otra parte, en una paciente (5%) se obtuvo una variante de significado clínico incierto (VUS). A continuación, se detallan los resultados.

#### MKRN3

En la paciente 15/0937 natural de Ecuador, radicada en España desde los 3 años, se encontró la variante NM\_005664.3: c.203G>A; NP\_005655.1:p.Arg68His, en el gen *MKRN3* en heterocigosis, que fue interpretada como probablemente patogénica. Esta paciente acudió a consulta por telarquia progresiva y aceleración del crecimiento desde los 7 años 6 meses. A los 8 años presentaba talla de 128,5 cm (+0,4 SDS), estadio puberal Tanner III (S3, P2, Aa), edad ósea de 10,5 años y pico de LH tras test de LHRH de 8 UI/L. Ambos progenitores eran de origen ecuatoriano, no consanguíneos. Su madre, no portadora de la variante, presentaba una talla de 154 cm (-1,27 SDS) y tuvo la menarquia a los 15 años. Los datos referidos del padre son los siguientes: talla de 168 cm (-1,26 SDS) y pubertad normal. No pudo realizarse el estudio al padre puesto que no pudo obtenerse la muestra de este al encontrarse en otro país y no mantener contacto con la familia.

Se trata de una variante de cambio de sentido que ocasiona el cambio de una guanina por una adenina en la posición 203. Este cambio, a su vez, generaría el cambio en la proteína de arginina a histidina en la posición 68. Esta variante ha sido descrita en bases de datos de población general con una frecuencia total muy baja de  $1,2 \times 10^{-5}$  (3/249834), y para etnia latinoamericana la frecuencia es de  $2,9 \times 10^{-5}$  (1/34570), estas frecuencias poblacionales fueron obtenidas de gnomAD (145). Por otra parte, este cambio estuvo ausente en la población control formada por 49 mujeres de etnia caucásica europea.

De los programas de predicción *in silico* consultados: SIFT, Polyphen2, FATHMM, sólo uno de ellos predijo que este cambio no sería tolerado. Se evaluó también la potencial afectación del *splicing* utilizando el programa Human Splicing Finder, el resultado fue que el cambio c.203G>A podría alterar un sitio exónico donador del *splicing*.

### KISS1 y KISS1R

En la paciente 15/0677 de origen africano, se detectó la variante NM\_002256.3: c.268C>G; NP\_002247:p.His90Asp en heterocigosis en el exón 3 del gen *KISS1*, en su padre no afecto también se detectó dicha variante. La frecuencia poblacional para etnia africana de dicha variante es de 0,02 (145).

La variante c.268C>G fue detectada mediante la técnica de NGS con una frecuencia, en los tres *pipelines*, de 49%, 47% y 53% para cada uno de ellos, por lo que se interpreta que la variante se encuentra en heterocigosis, pero, al realizar la comprobación de ésta mediante técnica de Sanger se obtuvo como resultado que el cambio se encontraba en homocigosis. En el padre se vio la variante en heterocigosis. Para comprobar que no hubiese una delección del exón 3 se realizó el estudio mediante PCR digital utilizando la sonda Taqman® para CNVs descrita en el apartado de pacientes y métodos. Los resultados de este estudio arrojaron que la probandus y sus progenitores eran portadores de dos copias del exón 3 del gen *KISS1*.

Adicionalmente, el polimorfismo NM\_002256.3:c.107A>G;NP\_002247:p.Gln36Arg que fue detectado en heterocigosis por NGS no fue detectado por técnica de Sanger y tampoco fue detectado por técnica Sanger en ninguno de los dos progenitores.

En el gen *KISS1* encontramos el polimorfismo NM\_002256.3 c.417delA; NP\_002247: p.Ter139TrpfsTer8 en 11 de las 20 pacientes estudiadas mediante NGS. Esta variante deleciona el último nucleótido del codón de parada nativo, lo que cambia el patrón de lectura, alargando el transcrito 8 codones. La frecuencia poblacional de esta variante es de 0,22 (22%) (145) por lo que fue catalogada como benigna.

En el gen *KISS1R* sólo se encontraron variantes benignas con frecuencias poblacionales mayores al 5% (145).

### TAC3 y TACR3

En la paciente 15/0569 de origen europeo se detectó la variante NM\_001059.2: c.1345G>A; NP\_001050.1: p.Ala449Thr en heterocigosis en el gen *TACR3*, su madre no afecta también es portadora de esta variante. La frecuencia poblacional para europeos de dicha variante es de 0,007, por todo esto se catalogó como variante de significado clínico incierto (145).

En una paciente, cuyos padres no emparentados procedían de Guinea Ecuatorial, se encontró la variante NM\_013251.3: c.295T>C; p.Ser99Pro en heterocigosis en el gen *TAC3*. Esta variante tiene una frecuencia poblacional general de 0,008 (145), pero en la población africana es de 0,08 (145), por lo que fue interpretada como benigna.

### GNRH1 y GNRHR

En los genes *GNRH1* y *GNRHR* sólo se encontraron variantes benignas con frecuencias poblacionales mayores al 5% (145).

### LIN28B

En este gen no encontramos variantes en la región codificante estudiada en ninguno de los pacientes.

En vista de que estudiamos estos genes con el kit de exoma clínico TSO, no podemos descartar que exista una delección/duplicación intragénica, en ninguno de los genes estudiados.

En la tabla 17 y 18 se detallan las variantes encontradas en el primer filtrado, su clasificación, frecuencia alélica en el grupo de estudio, en la población general, usando la base de datos gnomAD (145) y la frecuencia en el grupo control (en los casos escogidos). El cálculo de la frecuencia alélica se realizó dividiendo el número de alelos mutados observados sobre el número total de alelos estudiados. En la tabla 19 se detallan las variantes encontradas en el segundo filtrado.

Todos los exones de los genes estudiados estuvieron presentaron una cobertura adecuada con el kit de captura TSO y se obtuvo una profundidad (cantidad de lecturas de cada posición) de al menos 20x por posición en más del 95% de los casos. Los tres algoritmos bioinformáticos detectaron las mismas variantes en la mayoría de los casos,

en el anexo 3 se detallan las variantes con la profundidad de lecturas para cada variante; en rojo se resalta cuando la variante, aunque detectada, no cumplía con las características de calidad mínimas, profundidad mínima de 20X, frecuencia alélica mínima de 30%.

Tabla 17. Se resumen las variantes encontradas, en los 8 genes del primer filtrado del análisis de NGS (kit TSO), excepto el gen *MKRN3*. Se muestra la frecuencia alélica para el grupo estudiado, la cantidad de heterocigotos/homocigotos. En color rojo se muestra la frecuencia poblacional total (base de datos gnomAD). En color azul se muestra la frecuencia alélica en el grupo control (no todas las variantes fueron estudiadas en el grupo control).

Gen	Variante	FA   FA (%) N=20	Heterocigotos   Homocigotos	FA en grupo control (n=48)   gnomAD	Clasificación
<i>GNRH1</i>	NM_000825: c.59G>C NP_000816: p.Trp20Ser	0,275   (27,5)	GC:5   CC: 3	0,229	Benigna
<i>GNRHR</i>	NM_000406: c.453C>T NP_000397: p.Ser151=	0,100   (10)	CT: 4   TT: 0	0,075	Benigna
<i>KISS1</i>	NM_002256.3: c.58G>A. NP_002247.3: p.Glu20Lys	0,025   (2,5)	GA: 1   AA: 0	0,047   0,033	Benigna
	NM_002256.3: c.107A>G. NP_002247.3: p.Gln36Arg	0,025   (2,5)	AG: 1   GG: 0	0,010   0,052	Benigna
	NM_002256.3: c.242C>G. NP_002247.3: p.Pro81Arg	0,325   (32,5)	CG: 13   GG: 0	0,219   0,287	Benigna
	NM_002256.3 c.417delA NP_002247.3: p.Ter139TrpfsTer8	0,275   (27,5)	A-: 11   -: 0	0,219   0,287	Benigna
	NM_002256.3: c.268C>G. NP_002247.3: p.His90Asp	0,025   (2,5)	CG: 1   G: 0	0,000   0,002	VUS. Heredada progenitor sin fenotipo claro. Discordancia de resultado entre NGS y técnica Sanger
<i>KISS1R</i>	NM_032551.4: c.24A>C. NP_002247.3: p.Gly8=	0,175   (17,5)	AC: 5   CC: 1	0,161	Benigna
	NM_032551.4: c.1091T>A. NP_002247.3: p.Leu364His	0,025   (2,5)	TA: 1   AA: 0	0,794	Benigna
<i>TACR3</i>	NM_001059.2: c.1345G>A. NP_001050.1: p.Ala449Thr	0,025   (2,5)	GA: 1   A: 0	0,005	VUS. Heredada progenitor sin fenotipo
<i>TAC3</i>	NM_013251.3: c.295T>C; p.Ser99Pro	0,025   (2,5)	TC: 1   CC: 0	0,008	Benigna

FA: frecuencia alélica, VUS: variante de significado clínico incierto.



Tabla 18. Resumen de las variantes encontradas en el gen *MKRN3*, que fue estudiado en 20 pacientes utilizando la técnica de NGS (kit TSO) y en 11 pacientes utilizando la técnica de secuenciación Sanger. En los 31 pacientes, la región promotora fue estudiada utilizando la técnica Sanger no encontrándose ninguna variante.

Gen	Variante	FA   FA (%) N=31	Heterocigotos   Homocigotos	FA en grupo control (n=48)   gnomAD	Clasificación
<i>MKRN3</i>	NM_005664.3:c.203G>A NP_005655.1:p.Arg68His	0,016   (1,6)	GA: 1   AA: 0	0,000   1,68e-5	Probablemente Patogénica. No de origen materno, ADN paterno no disponible
	NM_005664.3:c.663C>T NP_005655.1:p.Pro221=	0,194   (19,4)	CT: 12   TT: 0	0,276	Benigna
	NM_005664.3:c.1224_1228del NP_005655.1: p.(Asn409Profs*11)	0,016   (1,6)	TAACT/-:1   -/-: 0	0,000   0,000	Patogénica. origen paterno, hermana afecta portadora

### 1.3.2 Secuenciación Sanger

#### Gen *MKRN3*

A partir de octubre de 2016, a los pacientes que iban siendo incluidos en el estudio se les realizaba el estudio de la región codificante del gen *MKRN3*. De esta forma, se estudiaron un total de 11 *probandus*.

En un paciente masculino de origen español se encontró la variante NM\_005664.3: c.1224\_1228del; NP\_005655.1: p.Asn409Profs\*11, en el gen *MKRN3* en heterocigosis, que fue interpretada como probablemente patogénica. Este paciente presentaba aumento de volumen testicular progresivo desde los 7 años. A los 8,5 años presentaba talla de 131,7 cm (+0,23 SDS), una edad ósea de 10,5 años, que corresponde a un estadio puberal Tanner II (volumen testicular bilateral de 6 ml, P3, Ab), edad ósea con 2 años de adelanto y el pico de LH tras estímulo fue de 8 UI/L. Este paciente era un caso familiar de PPCI: la hermana del paciente fue diagnosticada de PPCI a los 6 años. Una tía paterna tuvo la menarquia a los 9 años. El padre no recordaba los hitos del desarrollo puberal.

Tabla 19. Se resumen las variantes encontradas, en los 8 genes del segundo filtrado del análisis de NGS (kit TSO). Se muestra la frecuencia alélica para el grupo estudiado, la cantidad de heterocigotos/homocigotos. En color rojo se muestra la frecuencia poblacional total (base de datos gnomAD).

Gen	Variante	FA   FA (%) N=20	Heterocigotos   Homocigotos	FA en gnomAD	Clasificación
ADIPOQ	NM_001177800: c.331T>C NP_001171271:p.Tyr111His	0,025   (2,5)	TC: 1   CC: 0	0,021	Benigna
	NM_001177800: c.45T>G NP_001171271:p.Gly15=	0,05   (5)	TG: 2   GG: 0	0,129	Benigna
FSHB	NM_000510:c.59G>T NP_000501.1:p.Trp20Ser	0,025   (2,5)	GT: 1   TT: 0	0,002	Probablemente benigna
	NM_000510:c.228C>T NP_000501.1:p.Tyr76=	0,4   (40)	CT: 12   TT: 2	0,513	Benigna
FSHR	NM_000145: c.919G>A NP_000136:p.Ala307Thr	0,6   (60)	GA: 6   AA: 9	0,546	Benigna
	NM_000145: c.1878T>C NP_000136:p.Tyr626=	0,025   (2,5)	TC: 1   CC: 0	$7,97 \times 10^{-6}$	Probablemente benigna
	NM_000145: c.2039G>A NP_000136:p.Ser680Asn	0,575   (58)	GA: 7   AA: 8	0,574	Benigna
GHRL	NM_001134941: c.211C>A NP_01128413:p.Leu71Met	0,025   (2,5)	CA: 1   AA: 0	0,086	FR obesidad
	NM_001134941: c.266A>T NP_01128413:p.Gln89Leu	0,125   (12,5)	AT: 5   TT: 0	0,099	FR obesidad
LHB	NM_000894: c.15+9A>G	0,4   (40)	AG: 10   GG: 3	0,487	Benigna
	NM_000894: c.45G>A NP_000885 p.Met15Ile	0,025   (2,5)	GA: 1   AA: 0	0,01	Benigna
	NM_000894: c.82T>C NP_000885 p.Trp28Arg	0,075   (7,5)	TT: 3   CC: 0	0,066	Benigna
	NM_000894: c.104T>C NP_000885 p.Ile35Thr	0,075   (7,5)	TC: 3   CC: 0	0,052	Benigna
	NM_000894: c.114C>G NP_000885 p.Val38=	0,425   (42,5)	CG: 12   GG: 5	0,561	Benigna
	NM_000894: c.132A>C NP_000885 p.Pro44=	0,5   (50)	AA: 10   CC: 5	0,52	Benigna
	NM_000894: c.183+11T>C	0,5   (50)	TC: 10   CC: 5	0,52	Benigna
	NM_000894: c.285T>C NP_000885 p.Gly95=	0,625   (62,5)	TC: 13   CC: 6	0,613	Benigna
PDYN	NM_024411.4: 600T>C NP_077722: p.Trp20Ser	0,100   (10)	TC: 4   CC: 0	0,11	Benigna
PROKR2	NM_144773: c.585G>C NP_658986:p.Thr195=	0,825   (82,5)	GC: 7   CC: 13	0,744	Benigna

El estudio familiar demostró que la hermana, padre, una tía y un tío paterno eran portadores de la variante encontrada en el probandus (ver figura 14).

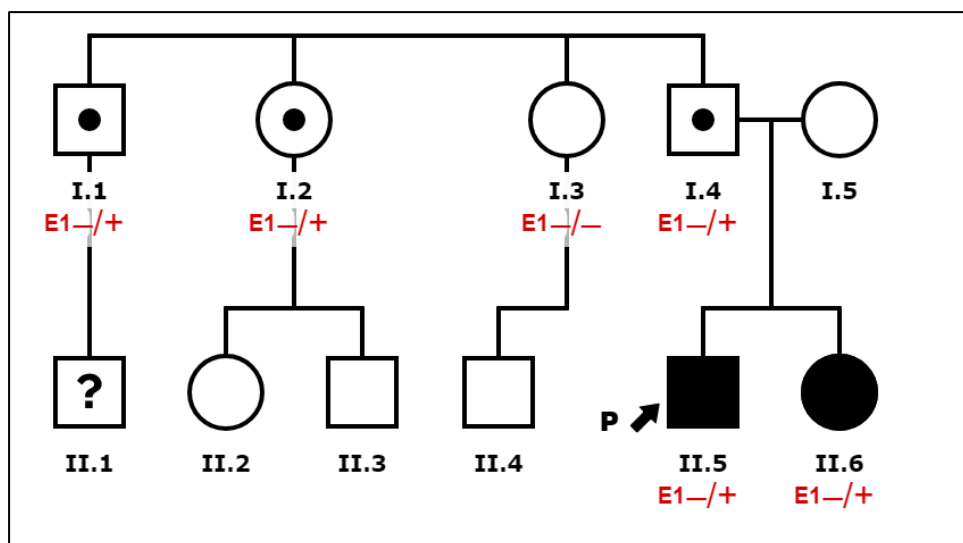


Figura 14. Genitograma de la familia PPCI-31. E1: c.1224\_1228del. Figuras rellenas: afectados, figuras con círculo en el centro: portadores.

La variante encontrada en esta familia es una delección de los cinco nucleótidos ubicados desde la posición 1124 hasta la 1228, que cambia el patrón de lectura, ocasionando en la proteína el cambio de una asparagina a una prolina en la posición 409 y la aparición de un codón de parada prematuro 11 aminoácidos después lo que daría lugar a una proteína truncada, afectando el último dedo de zinc C3H1 tipo 3.

Esta variante no ha sido descrita previamente ni en bases de datos de población general ni como causante de PPC, pero, se han descrito variantes de cambio de patrón de lectura y variantes de cambio de sentido como patogénicas ubicadas en ese mismo dominio proteico, último dedo de zinc C3H1 tipo 3 (72,78,88,90). Por todo ello, y por la segregación familiar compatible, se concluyó que esta variante era patogénica.

En la región promotora de *MKRN3* no se encontraron variantes en ninguno de los pacientes analizados. Las variantes encontradas y su frecuencia poblacional y en la población control se resume en la tabla 18.

### Gen *KISS1*

Se estudió la región 3'UTR del gen codificante de kisseptina1 para evaluar la presencia de polimorfismos que estuviesen sobrerrepresentados en el grupo de pacientes con PPCI, para esto se construyeron haplotipos con los polimorfismos enumerados en la tabla 20 y se escogieron los tres haplotipos más prevalentes en los 27 pacientes del grupo

PPCI estudiado, sus frecuencias alélicas se compararon con la población control (n alelos=92). Ninguno de los tres haplotipos tuvo un *odds ratio* (OR) significativo.

En particular, el polimorfismo c.\*74\_75insCA descrito en el artículo de *Huijbregts et al* (70) que, aunque con una frecuencia significativamente mayor en el grupo de PPCI que en el grupo control, no demostró que aumentara la expresión del gen *KISS1* en el estudio funcional realizado por estos investigadores, de hecho la expresión del gen reportero utilizado en el experimento diseñado por estos investigadores, era significativamente menor que la expresión del gen con la secuencia 3'UTR nativa. En nuestro análisis la frecuencia de esta variante en el grupo PPCI no fue significativamente mayor que la frecuencia en los controles estudiados.

Hap	c.417delA rs71745629	c.*67_68insT rs35128240	c.*70C>G rs1132506	c.*73G>C rs540653478	c.*74_75insCA rs200451423	Het. PPCI	Homo PPCI	Het control	Homo control	OR	IC 95%	p
WT	A	GG	C	G	GAC	15	8	20	19	referencia		
A	A	GG	G	C	GCAAC	2	0	10	0	0,589	0,125- 2,772	0,5
B	Del	GTG	G	C	GAC	1	1	1	0	1,076	0,215- 5,388	0,928
C	Del	GTG	G	G	GAC	12	0	9	3	1,554	0,542- 4,457	0,409
					GCAAC	4	0	10	0	0,656	0,196- 2,197	0,495

Tabla 20. Resumen con los polimorfismos de la región 3'UTR del gen *KISS1* estudiados en el grupo PPCI y en el grupo control, se incluye el polimorfismo que altera el codón de parada nativo c.417delA. Se muestran los haplotipos construidos, su frecuencia alélica en los dos grupos y el *odds ratio* calculado para cada haplotipo. Se muestra al final la frecuencia del polimorfismo c.\*74\_75insCA que corresponde al rs200451423, aunque en el trabajo de *Huijbregts et al* (70) lo mencionan como rs1132514 (que corresponde al cambio c.\*74G>C). Hap: haplotipo. Het: heterocigotos. Homo: homocigotos. OR: odds ratio.

### Gen *DLK1*

El estudio del gen *DLK1* solo detectó una variante que estaba presente en más del 50% de la población general (145), interpretada como benigna, datos recogidos en la tabla 21.

Gen	Variante	FA   FA (%) N=29	Heterocigotos   Homocigotos	FA gnomAD	Clasificación
<i>DLK1</i>	NM_001317172.1:c.564T>C NP_001304101.1:p.Ile188=	0,74   (74)	TC: 9   CC: 17	0,63	Benigna

Tabla 21. Resumen de las variantes encontradas en el gen *DLK1*, que fue estudiado en los 29 pacientes utilizando la técnica de secuenciación Sanger.

### 1.3.4 Estudio del cambio de número de copia

Utilizando la técnica de ME-MLPA (MRC Holland®) kit ME-032, que permite la evaluación, tanto del número de copia, como del estado de metilación de los genes *DLK1*, *MEG3* y *MIR380* ubicados en la región improntada del cromosoma 14, se estudió a los 29 *probandus* no diagnosticados luego de realizar los estudios anteriores, obteniendo un resultado normal en todos ellos. Lo que descarta delecciones/duplicaciones totales del gen *DLK1* o intragénicas localizadas en los exones 3-4, también se descarta la alteración de la metilación de la región improntada del cromosoma 14.

### 1.3.5 Estudio de la Disomía uniparental del cromosoma 14, citobanda 14q32.2

Se realizó el estudio mediante la amplificación de STRs y construcción de haplotipos, como se describió en el apartado de metodología, en 29 de las 31 familias incluidas. Dos de las familias no fueron estudiadas por tener diagnóstico con estudios previos y una de ellas no pudo ser estudiada por agotamiento de la muestra.

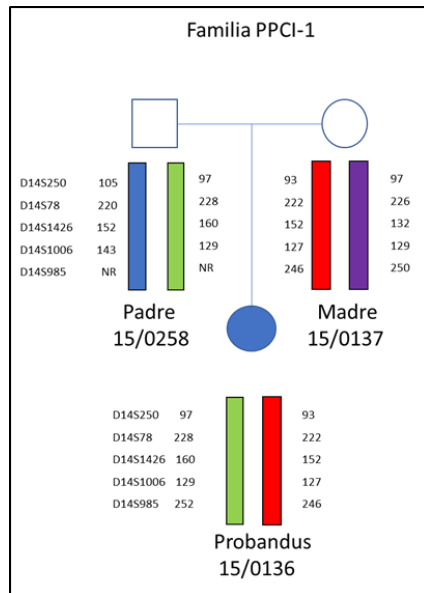
Se pudo descartar la DUP en 26 de 28 familias estudiadas, se muestran las familias en las que el resultado fue no informativo en la figura 15. Los haplotipos de todas las familias estudiadas se muestran en el anexo 4.

En tres de las familias estudiadas sólo contamos con la muestra de la madre y de la *probandus*. Aun así, pudimos descartar la presencia de la disomía uniparental del cromosoma 14, citobanda 14q32.2 en las tres *probandus*, ejemplo que se muestra en la figura 15.

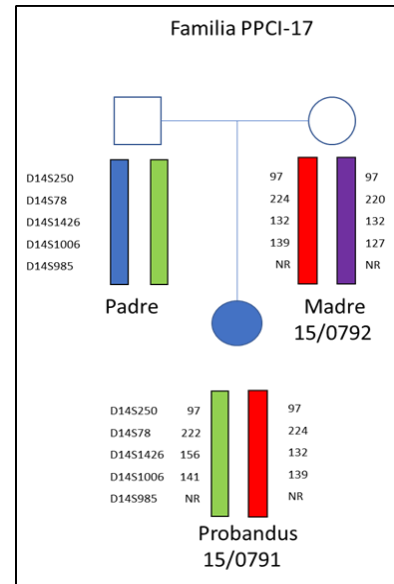
Con el estudio de MLPA descrito en el apartado anterior se descartó alteraciones del patrón de metilación de los 29 *probandus* estudiados por lo que, en conjunto con los

resultados del análisis de STRs, se concluye que no hay DUP del cromosoma 14 en los 29 pacientes estudiados.

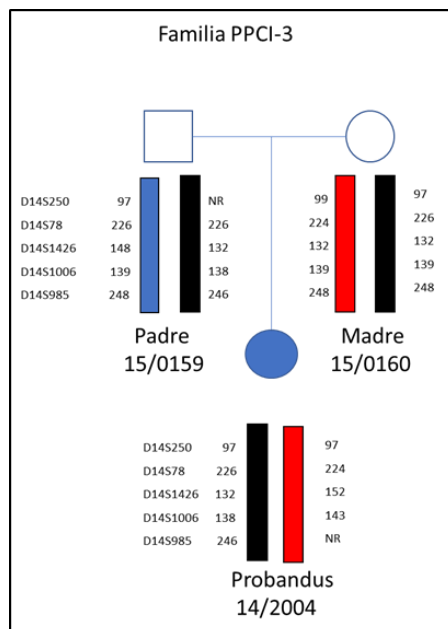
Figura 15. Ejemplo del haplotipo construido con los microsatélites estudiados. A) cuando teníamos a los 3 miembros de la familia. B) Cuando sólo teníamos 2 miembros de la familia. C) y D) Familias con haplotipos no informativos.



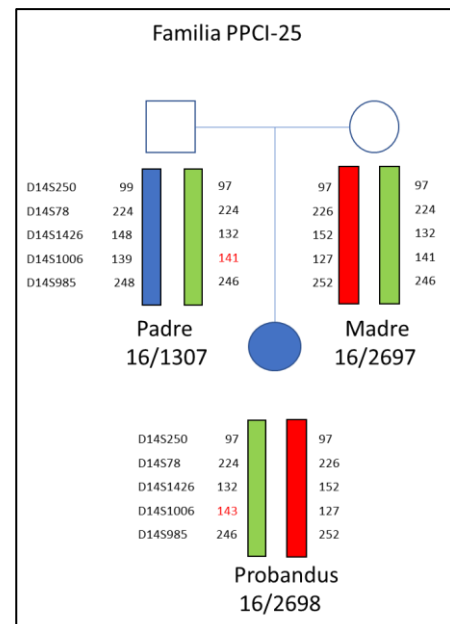
A)



B)



C)



D)

## 2. Grupo HHPc

Este grupo está compuesto por 7 pacientes no emparentados. Todos los pacientes son del sexo masculino. Se obtuvo un resultado positivo en el 43% (3/7) de los casos, un resultado no concluyente en el 43% (3/7) y negativo en el 14% (1/7) de los casos. El 43% de los pacientes se presentaron como síndrome de Kallmann y el 57% como HHPc sin alteración del olfato. A continuación, describimos en detalle los resultados de cada uno de los pacientes. Para la interpretación de las variantes obtenidas por NGS se utilizaron los mismos criterios técnicos: la variante tenía que estar cubierta por al menos 20 lecturas, con una frecuencia mínima de 30% del total de lecturas y tenía que ubicar a  $\pm 10$  pares de bases del exón. Todos los genes estudiados fueron bien cubiertos con el kit de captura CES v2, presentando una profundidad (cantidad de lecturas de cada posición) de al menos 20x por posición en más del 95% de los casos, exceptuando el gen *ANOS1* que presentó una cobertura en todas las muestras estudiadas de alrededor del 81%.

### **Paciente 17-3252**

Consulta por primera vez en Endocrinología Infantil a los 12 años 8 meses años por posible micropene.

Antecedentes personales: periodo neonatal sin incidencias. Destaca el diagnóstico de hipoacusia neurosensorial a los 2 años de vida. Así mismo, fue estudiado a los 3 años de vida en otro centro por micropene con los siguientes resultados: a) cariotipo 46, XY (masculino normal); b) LH basal indetectable; c) test de HCG (3 dosis): testosterona basal 0,2 ng/ml y tras estímulo 0,7 ng/ml; d) RM craneal normal. El paciente no presentaba otra sintomatología reseñable, salvo anosmia desde siempre, no evaluada previamente.

Sin antecedentes familiares de retraso puberal, ni infertilidad. Padres caucásicos no consanguíneos. Madre menarquia a los 13 años. Padre desarrollo puberal normal. Talla genética de 170,5 cm (-0,48 SDS).

A la exploración física a los 12 años 8 meses presentaba los siguientes datos: talla de 153,3 cm (+0,07 SDS) e IMC de 19,8Kg/m<sup>2</sup> (0,10 SDS). Estadio puberal Tanner I: teste derecho de 2 ml de Prader e izquierdo de 1 ml de Prader, con un pene de 4 x 1,5 cm (-2,45 SDS).

A los 12 años y medio presentaba:

- Edad ósea acorde con edad cronológica.
- LH y FSH basales indetectables.
- Ecografía abdominal normal.

A los 14 años y medio, tras haber recibido 6 dosis de testosterona (50 mg al mes) seguía en estadio puberal Tanner 1 con testes en bolsa de 2 ml de Prader. En ese momento, se le realizó test de UPSIT para valoración de la olfacción con el siguiente resultado: 8/40, compatible con anosmia.

Con los datos clínicos de hipogonadismo hipogonadotropo en el contexto de un paciente con anosmia se realizó el estudio de exoma filtrado por genes relacionados a síndrome de Kallmann con hallazgo de la variante catalogada como probablemente patogénica (según criterios de la ACMG(131)) en el gen *SOX10* NM\_006941: c.929dupT; NP\_008872: p.Ser311Glu\*91, en heterocigosis. Esta variante inserta una timina en la posición 929 que cambia el patrón de lectura, ocasionando en el ARNm el cambio de una serina a un ácido glutámico en la posición 311 y los aminoácidos subsiguientes con la aparición de un codón de parada prematuro 91 codones después lo que daría lugar a una proteína truncada con 402 aminoácidos en vez de los 466 aminoácidos de la proteína nativa. Esta variante no ha sido descrita en las bases de datos poblacionales, ni ha sido descrita como causante de enfermedad, pero otras variantes que cambian el patrón de lectura han sido descritas como patogénicas en este gen.

En la actualidad tiene 20 años y recibe terapia con testosterona (200 mg cada 3 semanas de forma intramuscular). Recibió tratamiento combinado con gonadotropinas combinadas desde los 14,5 a los 16,5 años, alcanzando un tamaño testicular de 10 ml de Prader que mantiene en la última revisión.

### **Paciente 13-2928:**

Consultó por primera vez en Endocrinología Infantil a los 15 años 7 meses por desaceleración de la velocidad de crecimiento.

Antecedentes personales: periodo neonatal sin incidencias. Presenta asma episódica sin necesidad de tratamiento de mantenimiento. Sin antecedentes de criptorquidia, micropene o anosmia.

Antecedentes familiares: padres caucásicos no consanguíneos, madre 160 cm (-0,1 SDS), menarquia a los 13 años. Padre 170 cm (-0,53 SDS), pubertad algo tardía.



A la exploración presentaba los siguientes hallazgos: talla de 161,8 cm (-1,1 SDS), IMC de 20,8Kg/m<sup>2</sup> (-0,15 SDS). Estadio puberal Tanner II: testes en bolsas de 5 ml, p2, Ab.

Aportaba los siguientes estudios:

- Analítica sanguínea de otro centro con: LH, FSH y testosterona basales indetectables. Así mismo, presentaba anticuerpos anti-transglutaminasa negativos.
- Edad ósea con retraso de un año y medio con respecto a la edad cronológica.

A los 17 años 3 meses presentaba una talla de 166,8 cm (-0,84 SDS), con una velocidad de crecimiento de 3,6 cm/año (-3,34 SDS) y su desarrollo puberal se encontraba estancado en Tanner II (testes: 5ml, P3, Ab).

Con el diagnóstico diferencial entre un retraso constitucional del crecimiento y pubertad frente a un hipogonadismo hipogonadotrofo permanente, se solicitaron las siguientes pruebas:

- Edad ósea de 15 años y medio para una edad cronológica de 17 años y medio, es decir, edad ósea con retraso de 2 años.
- Test de LHRH: pico de LH de 6,4 UI/L.
- Testosterona basal: 0,15 ng/ml (VN: >0,5).
- Inhibina B: 108 pg/ml (VN: 133-330).
- Se descartó de nuevo enfermedad celíaca y los reactantes de fase aguda fueron negativos.
- Con la sospecha de hipogonadismo hipogonadotrofo congénito se solicitó RM craneal que resultó ser normal.
- Se solicitó la prueba de UPSIT con puntuación de 36/40, compatible con olfato adecuado.

Se inició tratamiento sustitutivo con testosterona a los 18 años 5 meses, con dosis crecientes.

Se realizó el estudio de exoma filtrado por genes relacionados al HHPc sin anosmia que fue negativo. Por lo que se analizaron los genes relacionados al síndrome de Kallmann con hallazgo de la variante catalogada como probablemente patogénica (según criterios de la ACMG (131)) en el gen *SOX10* NM\_006941: c.473A>C; NP\_008872: p.Glu158Ala en heterocigosis. Esta variante cambia la adenina en la posición 473 por una

citosina, ocasionando en la proteína el cambio de un ácido glutámico en la posición 158 por una alanina, esta variante no ha sido descrita previamente en bases de datos poblacionales, se encuentra en un dominio funcional y los predictores *in silico* la catalogan como poco tolerada.

En la revisión clínica más reciente, a los 21 años, recibía tratamiento con testosterona a la dosis de 200 mg cada 3 semanas con la siguiente exploración genital: testículos de 8ml, P5, Ac.

### **Paciente JLDM:**

Consulta por primera vez a Endocrinología Infantil a los 15 años 9 meses por presentar retraso puberal.

Antecedentes personales: periodo neonatal sin incidencias. Fue intervenido de herniorrafía inguinal bilateral a los 15 meses de vida, a los 5 años 9 meses se le practicó orquidopexia izquierda y a los 8 años orquidopexia derecha. Asimismo, refería alteración del olfato no evaluada previamente.

Antecedentes familiares: padres caucásicos no consanguíneos. Madre 165 cm (0,54 SDS), menarquia 13 años. Padre 170 cm (-0,54 SDS) con desarrollo puberal normal. Un tío paterno recibió tratamiento con testosterona durante la adolescencia.

A la exploración física presentaba: talla de 161 cm (-1,18 SDS) y estadio puberal Tanner I (testes en bolsas de 2ml, P1, Aa). Pene normoconfigurado.

Ante la presencia de retraso puberal, antecedente de criptorquidia y alteración del olfato se realizan las siguientes pruebas complementarias:

- Edad ósea de 13 años para 15 años 9 meses de edad cronológica.
- Test LHRH: pico de LH de 0,8 UI/L.
- Testosterona basal: 0,39 ng/ml (VN: >0,7).
- Inhibina B: 17 pg/ml (VN: 80-300).

Tras confirmar la presencia de un hipogonadismo, se solicita una RM craneal donde se evidencia la ausencia de tractos y bulbos olfatorios, ver figura 16.

Teniendo en cuenta los datos anteriormente expuestos, se solicita un panel de genes relacionados con SK con el hallazgo de la variante catalogada como patogénica

(según criterios de la ACMG (131)) en el gen *ANOS1* NM\_000216.4: c.932\_941delTCACTATAGT; NP\_000207: p.Val311Leufs\*25 en hemicigosis.

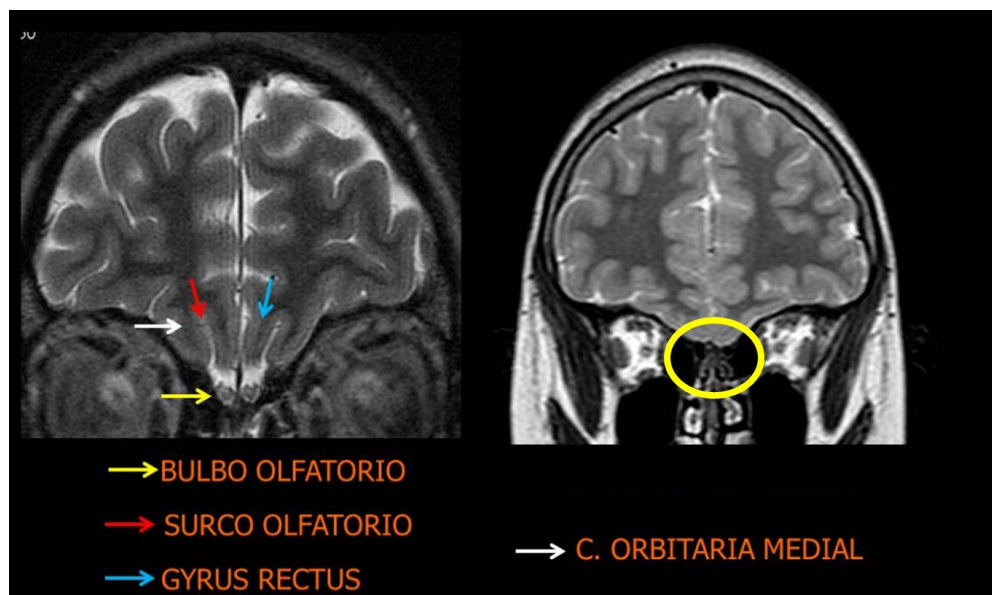


Figura 16. Imagen de RM craneal (T2) donde se muestra bulbos olfatorios normales (izquierda flecha amarilla) y con ausencia de bulbos olfatorios derecha encerrado en la circunferencia, modificado de (146)

Se demostró que la madre biológica no era portadora de dicha variante, por lo que se concluyó que era *de novo*. Esta variante deletiona los diez nucleótidos ubicados desde la posición 932 a la posición 941, y cambia el patrón de lectura, ocasionando en la proteína el cambio de una valina a leucina en la posición 311 y a su vez cambio de los aminoácidos subsiguientes con la aparición de un codón de parada prematuro 25 codones después lo que daría lugar a una proteína truncada con 336 aminoácidos en vez de los 680 aminoácidos de la proteína nativa. Esta variante no ha sido descrita en las bases de datos poblacionales ni documentada como causante de enfermedad, pero otras variantes que cambian el patrón de lectura han sido descritas como patogénicas en este gen.

En la actualidad, este paciente tiene 27 años y recibió tratamiento combinado con gonadotropina coriónica humana (HCG) y gonadotropina menopáusica humana (HMG) durante un año. Posteriormente, recibió terapia con testosterona a dosis progresivas. Actualmente recibe tratamiento con testosterona a la dosis de 200 mg cada 3 semanas con la siguiente exploración genital: testes de 6 ml, P5, Ac.

### **Paciente 18-0491:**

Consultó en Endocrinología Infantil por primera vez a los 6 años para valoración de maldescenso testicular.

Antecedentes personales: periodo neonatal sin incidencias. A los 3 años de vida recibió un tratamiento hormonal (no precisado) por supuesta criptorquidia.

Antecedentes familiares: padres caucásicos no consanguíneos. Madre 160 cm (-0,1 SDS) y menarquia a los 12 años. Padre 168 cm (-0,81 SDS), pubertad temprana con antecedente de testículos en ascensor. Tío materno con problemas de fertilidad y primo por rama materna con criptorquidia bilateral.

A la exploración física destacan los siguientes datos: talla de 112,5 cm (-1,06 SDS), IMC de 16,99Kg/m<sup>2</sup> (0,51 SDS), estadio puberal Tanner I (testes 2 ml, P1, Aa). Cabe reseñar, que presentaba testículos en ascensor que se bajaban a bolsa manualmente y se mantenían. Por otro lado, presentaba un pene normoconfigurado de 2,5 cm x 1cm (-2,5 SDS).

Con el diagnóstico de micropene y maldescenso testicular se solicitaron las siguientes pruebas diagnósticas:

- Eje gonadotropo: LH basal <0,2UI/L, FSH <0,6UI/L, inhibina B <15pg/ml (6-98).
- Eje somatotropo: IGF-I: 132 ng/ml (36-191).
- Eje: tirotropo: TSH: 3,82 UI/L (0,46-4,6), T4 libre: 0,92 ng/ml (0,98-2,19)
- Test de HCG (3 dosis): testosterona basal de 0,1 ng/ml y pico de 0,13 ng/ml (respuesta anómala).
- Ecografía abdominal normal.

Con la sospecha de un cuadro de hipogonadismo hipogonadotropo congénito, aparentemente sin anosmia, se solicita una RM craneal en la que no hay hallazgos reseñables, incluida la zona de bulbos olfatorios.

A los 6 años 6 meses se le aplicó un ciclo de testosterona de 50 mg al mes por 6 meses, para el tratamiento del micropene.

A los 12 años le intervinieron de orquidopexia bilateral.

A los 14 años tenía una talla de 153,5 cm (-0,91 SDS) e IMC: 20,37 kg/m<sup>2</sup> (0,08 SDS), estadio puberal Tanner I (testes fijados en bolsa de 2ml, P2, Ab), pene de 5 cm x 1,5cm. En ese momento se realizan las siguientes pruebas:

- Edad ósea de 12 años.
- Test de LHRH: pico de LH 0,7 UI/L.

- Testosterona: 0,29 ng/ml (VN >0,5).
- Inhibina B: 10 pg/ml (VN >90).
- Test de UPSIT 32/40, compatible con olfacción en el límite inferior de la normalidad.

Se realizó el estudio de exoma filtrado por genes relacionados a HHPc sin anosmia con resultado negativo, por lo que se analizaron los genes relacionados al síndrome de Kallmann con hallazgo de la variante catalogada como VUS (ACMG) en el gen *SEMA3A* NM\_006080: c.1303G>A; NP\_006071: p.Val435Ile en heterocigosis. Esta variante cambia la guanina en la posición 1303 por una adenina, ocasionando en la proteína el cambio de la valina en la posición 435 por una isoleucina. Esta variante ha sido descrita en las bases de datos poblacionales con el código rs147436181 y una frecuencia alélica poblacional de 0,014 (gnomAD), ha sido descrita como causante de enfermedad, pero sólo en pacientes con una variante patogénica en otro de los genes implicados en HHPc (*PROK2*, *PROKR2*, *FGFR1*) (147).

Actualmente tiene 15 años 4 meses y lleva en tratamiento combinado con HCG y HMG desde hace 14 meses con el siguiente resultado: teste izquierdo de 9 ml y teste derecho 11 ml, P4, Ab y una velocidad de crecimiento de 7,1 cm/año (-0,2 SDS).

### **Paciente 18-3079:**

Consultó a los 19 años por primera vez en Endocrinología Infantil por retraso puberal.

Antecedentes personales: periodo neonatal sin incidencias. Intervenido de fimosis a los 5 años y de apendicitis a los 8 años. Sin aparente alteración del olfato. Aportaba cariotipo de 46, XY (masculino normal) y RM craneal que incluía bulbos olfatorios: dentro de la normalidad.

Antecedentes familiares: padres no consanguíneos. Madre de origen italo-chino 161 cm (-1,18 SDS) y menarquia a los 13 años. Padre de origen español, 180 cm (0,78 SDS) con pubertad tardía y diagnosticado de oligospermia antes de tener su primer hijo.

Presentaba los siguientes hallazgos exploratorios: talla de 176 cm (0,07 SDS), IMC: 18,24Kg/m<sup>2</sup> (-0,93 SDS), estadio puberal de Tanner I (teste derecho: 3ml, izquierdo: 2ml, P2, Aa). Pene normoconfigurado de 5,5 x 2cm.

Pruebas realizadas:

- Hemograma, bioquímica general, reactantes de fase aguda y anticuerpos de enfermedad celiaca negativos.

- Edad ósea de 15 años para edad cronológica de 19 años.
- Test de LHRH: pico de LH 2,1 UI/L.
- Testosterona 0,2 ng/ml (VN > 0,5).
- Inhibina B 12 pg/ml (VN >90).
- Test de UPSIT: 36/40, compatible con olfato normal.

Se realizó el estudio de exoma filtrado por genes relacionados a HHPc sin anosmia que fue negativo. Posteriormente, se analizaron los genes relacionados al síndrome de Kallmann, obteniendo también un resultado negativo.

En estos momentos tiene 20 años y lleva 10 meses con tratamiento combinado de HMG y HCG con el siguiente resultado: teste izquierdo de 8 ml y teste derecho de 9 ml, pene normoconfigurado de 8 x 3 cm.

A continuación, se describen los pacientes reclutados de la consulta de Endocrinología de Adultos.

### **Paciente 18-3230:**

Consulta por primera vez a los 22 años en la consulta de Endocrinología de adultos por retraso puberal.

Antecedentes personales: natural de Rumanía, en España desde los 16 años. Periodo neonatal sin incidencias. Alteración del olfato y maldescenso testicular no intervenido.

Antecedentes familiares: padres no consanguíneos de origen rumano. Madre 160 cm (-0,1 SDS) y padre de 175 cm (0,12 SDS). Hermana con posible microsmia. Tío materno con problemas de fertilidad.

Exploración física a los 22 años: talla de 162 cm (-2,25 SDS), IMC de 22,86Kg/m<sup>2</sup> (+0,30 SDS) y estadio puberal Tanner I: teste izquierdo de 3 ml, no se palpa teste derecho, P2 y Aa.

Pruebas complementarias:

- Edad ósea de 15 años y medio para una edad cronológica de 22 años.
- FSH basal de 2,2 UI/L y LH basal de 0,4 UI/L.
- Testosterona 0,1 ng/ml (>0,5).

- RM craneal sin alteraciones de bulbos olfatorios.
- Test de UPSIT: 26/40, compatible con microsmia.
- Por la evolución prolongada del hipogonadismo se realiza Densitometría ósea (DEXA): columna lumbar -3,6 SDS y cuello de fémur -2,2 SDS.

Se realizó el estudio de exoma filtrado por genes relacionados a síndrome de Kallmann con hallazgo de la variante catalogada como VUS (ACMG) en el gen *NSMF* NM\_001130969: c.419G>T; NP\_001124441: p.Arg140Leu, en heterocigosis. Esta variante cambia la guanina en la posición 419 por una timina, ocasionando en la proteína el cambio de la arginina en la posición 140 por una leucina. Este gen está asociado al hipogonadismo con patrón de herencia oligogénico o autosómico dominante con penetrancia incompleta. Además, presentaba la VUS en el gen *CHD7* NM\_017780:c.4226T>A;p.Val1409Glu en heterocigosis, esta variante cambia la timina en la posición 4226 por una adenina, en la proteína esta variantes produce el cambio de una valina por un ácido glutámico en la posición 1409, esta variante no ha sido descrita en bases de datos de población general ni ha sido reportada como causante de enfermedad, este gen se encuentra relacionado con el SK con patrón de herencia autosómico dominante y no está reportada la herencia oligogénica. En el resto de los genes estudiados, el paciente sólo presenta variantes benignas, por lo que el estudio es no concluyente.

Actualmente tiene 23 años y recibe terapia con testosterona gel. Recientemente intervenido de orquidopexia derecha.

### **Paciente 17-3285:**

Paciente en seguimiento en la consulta de Endocrinología de Adultos por sospecha de síndrome de Kallmann.

Antecedentes personales: periodo neonatal sin incidencias aparentes. Intervenido de apendicitis. Diagnosticado a los 17 años de posible síndrome de Kallmann en Hospital de Guadalajara (hipogonadismo hipogonadotrópico permanente congénito y alteración del olfato).

Antecedentes familiares: padres no consanguíneos, sin antecedentes de interés.

Exploración a los 29 años: talla de 188 cm (+2,53 SDS) e IMC: 22,23 kg/m<sup>2</sup> (0,18 SDS). No se ha podido recoger información sobre volumen testicular. En la anamnesis refiere anosmia. A la vista de recibir tratamiento con testosterona los valores

hormonales no son valorables. Se solicitó RM cerebral: sin alteraciones de bulbos olfatorios.

Se realizó el estudio de exoma filtrado por genes relacionados a síndrome de Kallmann con hallazgo de la variante catalogada como probablemente patogénica (ACMG) en el gen *NSMF* NM\_001130969: c.924C>G; NP\_001124441: p.Ser308Arg en heterocigosis. Esta variante cambia la citosina en la posición 924 por una guanina, ocasionando en la proteína el cambio de la serina en la posición 308 por una arginina. Por otro lado, el nucleótido 924 es el segundo nucleótido del exón 9 por lo que se encuentra ubicado en la zona canónica del *splicing* del exón 9. Este gen está asociado al hipogonadismo con patrón de herencia autosómico oligogénico o autosómico dominante con penetrancia incompleta, y en el resto de los genes estudiados, el paciente sólo presenta variantes benignas. En vista de esto el estudio fue no concluyente.

En la tabla 22 se resumen las variantes encontradas en cada uno de los pacientes.

Paciente	Gen	Variante	Cigosidad	FA <b>gnomAD</b>	Clasificación
17-3252	<i>SOX10</i>	NM_006941: c.929dupT NP_008872:p.Ser311Glufs*91	Heterocigoto	0	Probablemente patogénica
13-2928	<i>SOX10</i>	NM_006941: c.473A>C NP_008872:p.Glu158Ala	Heterocigoto	0	Probablemente patogénica
JLDM	<i>ANOS1</i>	NM_000216.4:c.932_941delTCA CTATAGT NP_000207:p.Val311Leufs*25	Hemicigoto	0	Patogénica
18-0491	<i>SEMA3A</i>	NM_006080: c.1303G>A NP_006071: p.Val435Ile	Heterocigoto	0,014	VUS
18-3079	-	-	-	-	-
18-3230	<i>NSMF</i>	NM_001130969: c.419G>T NP_001124441: p.Arg140Leu	Heterocigoto	0	VUS
	<i>CHD7</i>	NM_017780: c.4226T>A NP_060250: p.Val1409Glu	Heterocigoto	0	VUS
17-3285	<i>NSMF</i>	NM_001130969: c.924C>G NP_001124441: p.Ser308Arg	Heterocigoto	0	Probablemente patogénica

Tabla 22. Resumen de las variantes encontradas en cada uno de los pacientes del grupo HHPc.



## Discusión

La pubertad es un proceso biológico complejo que marca el paso de transición de la vida infantil a la vida adulta y reproductiva del individuo. Como proceso complejo que es, la regulación de los mecanismos que marcan su inicio y sus siguientes etapas están regulados por multitud de factores tanto genéticos como ambientales. Por lo tanto, cualquier anomalía o conjunto de anomalías en este intrincado proceso podría alterarlo, ya sea adelantándolo o impidiendo su inicio y desarrollo.

Las alteraciones génicas, es decir, alteraciones en un solo gen, han demostrado ser causales de la patología puberal, sobre todo cuando hablamos del HHPc. En estos pacientes es posible encontrar la alteración responsable hasta en la mitad de los casos, como es el caso del presente trabajo. En el caso de la PPCI las alteraciones génicas sólo representan un pequeño porcentaje (<10%) de los casos esporádicos y alrededor de un tercio de los casos familiares, siendo en la mayoría de los casos variantes de pérdida de función en el gen *MKRN3*.

Por otro lado, en el caso del HHPc el análisis de múltiples genes ha permitido encontrar variantes causales en genes con patrones de herencia autosómico dominante, autosómico recesivo, incluso se ha puesto en evidencia la posibilidad de herencia oligogénica. Este hecho se ha basado en el hallazgo en un mismo paciente de dos o más variantes potencialmente patogénicas en dos o más genes implicados en HHPc (114,118). Gracias a las técnicas de secuenciación masiva y el desarrollo de algoritmos de análisis y jerarquización de variantes se podrá refinar de forma más adecuada el patrón de herencia oligogénico. En nuestra opinión, no es descabellado pensar que en un futuro cercano pueda convertirse en la forma de herencia más frecuente.

Un fenómeno a resaltar en el caso de los pacientes con hipogonadismo, es el hecho de que las alteraciones génicas más frecuentemente encontradas en conjunto, son las alteraciones relacionadas con la migración de las neuronas productoras de GnRH durante la vida embrionaria, de éstas destacan: i) la vía de señalización de FGFR1/FGF8, puesto que alteraciones en los genes que codifican estas proteínas o proteínas que interactúan con esta vía (*FGFR1*, *FGF8*, *ANOS1*, *IL17RD*, entre otros) representan el 20% de las causas de HHPc, ii) la vía de la prokinetina-2 y su receptor que representan aproximadamente el 5% y las variantes en *CDH7* que representan 5-10% (121,122). Lo que sumaría aproximadamente 35% de las variantes encontradas en pacientes con HHPc. En contrapartida, los genes relacionados con la producción de GnRH una vez que las neuronas están instaladas y funcionantes (*GNRHR*, *TACaR3*, *GNRH1*, *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3*) representarían cerca del 15% restante. De este grupo destacan las variantes patogénicas en el receptor de GnRH.

A continuación, se discutirán en detalle los resultados obtenidos en uno y otro grupo.

## Grupo PPCI

En nuestra muestra la rentabilidad del estudio genético global (incluyendo todas las técnicas) fue de 6,5%, siendo el gen *MKRN3* el único con hallazgos causales, lo que concuerda con lo reportado en otras series (13,57,65,72,82,89,90,92). Si separamos la muestra en casos familiares y esporádicos, la rentabilidad para los casos familiares fue de 8,3% y para los casos esporádicos de 5,3%. Aunque en algunas series publicadas la rentabilidad de los casos familiares es mayor, alcanzando hasta el 46% (72,77,83) hay otras que obtienen resultados similares a los nuestros (90,148). Estas diferencias pueden explicarse porque en las cohortes con alta rentabilidad diagnóstica se contaba con familias con mayor número de casos índices en varias generaciones, en las series con menor rentabilidad, como la nuestra, los antecedentes familiares recogidos muchas veces afectaban a una sola generación o existía la sospecha de transmisión a través de la madre, lo que no concuerda con el patrón de herencia relacionado a *MKRN3*. Además, otro factor a tener en consideración es el tamaño muestral.

En cuanto a los casos esporádicos, nuestra rentabilidad estuvo en concordancia o superior con lo publicado en la literatura científica hasta ahora (82,90,92). Esto puede deberse a que es una muestra con un fenotipo muy bien seleccionado donde las variantes de la normalidad (telarquia prematura, pubertad adelantada, adrenarquia prematura), que pueden confundirse con la PPCI, no se incluyeron en el estudio.

### Gen *MKRN3*

Inicialmente, este gen fue analizado en 20 pacientes utilizando la técnica de NGS con la que se secuenció el exoma clínico filtrado por un listado de genes relacionados con la producción y homeostasis de la GnRH. En este primer subgrupo se encontró sólo una variante probablemente patogénica en una paciente del grupo de casos esporádicos.

A partir de 2016 teniendo en cuenta los datos publicados en la literatura (57) y tras haber analizado parte de los pacientes incluidos en el estudio (62,149) decidimos cambiar el abordaje del estudio, realizando primero la secuenciación de la región codificante de *MKRN3* utilizando la técnica de secuenciación Sanger, puesto que este

gen representa la causa monogénica más prevalente en pacientes con PPCI y su abordaje por la técnica de secuenciación clásica es sencilla y económica.

Al cambiar el abordaje se estudiaron 11 familias adicionales, detectándose en un *probandus* del grupo de casos familiares la variante NM\_005664.3:c.1224\_1228delNP\_005655.1: p.(Asn409Profs\*11), que también estuvo presente en su hermana afecta, su padre portador y dos de tres tíos paternos. Esta variante no ha sido descrita previamente, pero la clasificamos como patogénica, siguiendo los criterios de la ACMG (131).

Este estudio permitió ofrecer un adecuado asesoramiento genético familiar y se pudo detectar al individuo II.1 del árbol genealógico (ver figura 14 en página 94) con riesgo de desarrollar PPCI, este individuo fue evaluado a los 2 años en la consulta de Endocrinología Infantil de la Fundación Jiménez Díaz, descartándose cambios físicos correspondientes a PPC y actualmente se está realizando el estudio de la variante patogénica familiar.

Como se comentó anteriormente, las variantes patogénicas en *MKRN3* en nuestra serie representaron el 6,5% del total de individuos estudiados y fue el único gen con hallazgos patológicos en la región codificante.

El estudio de la región promotora de *MKRN3* no demostró la presencia de ninguna variante en nuestra muestra. En la literatura, según nuestro conocimiento, sólo se han descrito dos individuos con una variante en la región promotora de este gen relacionada con la PPCI (93,95). No es de extrañar que en nuestra serie no encontrásemos variantes en la región promotora, puesto que éstas han sido reportadas únicamente en 2 de 217 individuos estudiados (0,01%), si unimos las series de *Macedo et al* (93) y de *Lu et al* (95).

Por otro lado, el análisis de cambio de número de copia de los 31 pacientes fue negativo. Hay que tomar en consideración las limitaciones de nuestro abordaje, que fue utilizar un kit de MLPA que sólo contiene una sonda en la región codificante de *MKRN3* localizada en NM\_005664.3: c.1296-1297, por lo que no podemos descartar con toda seguridad la presencia de una delección o duplicación que incluya todo el gen que no sea susceptible de ser detectada mediante esta técnica.

### Gen *KISS1*

A pesar de la relación de kisseptina1 con la producción de GnRH y el inicio de la pubertad sólo se han descrito variantes patogénicas en *KISS1* responsables de PPCI en un paciente (66). Después de la publicación inicial en 2010, numerosos grupos han estudiado

estos genes en series de pacientes con PPCI sin encontrar variantes que pudiesen ser catalogadas como patogénicas o probablemente patogénicas. En nuestro caso, encontramos la variante de significado incierto NM\_002256.3:c.268C>G; NP\_002247.3:p.His90Asp, previamente publicada por *Silveira et al* (66) en dos niñas no emparentadas en homocigosis, pero que en los estudios funcionales realizados no pudo demostrarse una ganancia de función, mecanismo por el que se produciría la PPCI relacionado a alteraciones en kisleptina1, por lo que esta variante no pudo ser catalogada como patogénica.

En nuestra investigación, también se encontró esta misma variante en la paciente 15/0677, en heterocigosis según la técnica de NGS. Pero, al estudiar esta variante por técnica de Sanger para su validación y segregación familiar se vio que estaba presente en homocigosis en la *probandus* y en heterocigosis en el padre, que no tenía antecedentes de PPCI. Se realizaron varios experimentos para descartar la presencia de una delección del alelo materno. Para ello se realizó un diseño para PCR digital utilizando una sonda comercial TaqMan® de CNV diseñada para el exón 3 de *KISS1*.

En ese mismo exón 3, la paciente 15/0677 presentaba, según la técnica de NGS el polimorfismo c.107A>G en heterocigosis. Al realizar la secuenciación Sanger para la validación de la variante c.268C>G no se observó la presencia del polimorfismo c.107A>G a pesar de estar incluido en el diseño realizado para la amplificación y secuenciación del exón 3. Por todo esto, concluimos que había un fenómeno de amplificación preferencial del alelo con la variante c.268C>G en la secuenciación Sanger, que pudiese estar condicionado por características propias de la muestra o imprecisión de las temperaturas de alineamiento en los termocicladores. También podría explicarse por la presencia de uno o varios SNPs en la región reconocida por el cebador que no permitiría el reconocimiento y por lo tanto la amplificación del alelo WT. Esta es una de limitaciones y fuente de error inherente a la técnica Sanger.

En cuanto al análisis de la región 3'UTR del gen *KISS1* para el análisis de los polimorfismos descritos por *Huijbregts et al* (70) se comparó la frecuencia alélica del polimorfismo c.\*74\_75insCA en 27 de los pacientes del grupo PPCI y el grupo control mediante el cálculo del *odds ratio*. Este análisis no demostró diferencias significativas entre la frecuencia de este polimorfismo en el grupo PPCI y el grupo control. Se construyeron, además, haplotipos con los polimorfismos observados en esta región, y siguiendo la misma metodología de análisis, tampoco observamos diferencias significativas entre un grupo y el otro.

Nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos por *Huijbregts et al* (70), aunque, debemos recordar que en ese mismo estudio la presencia de esta variante se asoció a una menor expresión del gen reportero, es decir, se esperaría que afectara negativamente la expresión de *KISS1 in vivo* lo que no sería esperable con el fenotipo PPCI, donde se esperaría una mayor expresión de este gen como causa del fenotipo. Sin embargo, no es descabellado pensar que estos cambios conformacionales puedan afectar la expresión de *KISS1*, por ejemplo, favoreciendo o no el acoplamiento de factores represores o activadores de la transcripción.

### Gen *TACR3*

En el gen codificante del receptor de neurokinina B, *TACR3*, encontramos la variante de cambio de sentido NM\_001059.2:c.1345G>A. NP\_001050.1: p.Ala449Thr, en una paciente y en su madre no afecta de PPCI, en heterocigosis. Esta variante se encuentra ubicada en el dominio intracelular del receptor, ha sido descrita en las bases de datos poblacionales con el número rs17033889, en gnomAD tiene una frecuencia poblacional de 0,005; se han descrito 7 individuos homocigotos 3 de los cuales son europeos. Los predictores *in silico* MutationTaster, FATHMM, Polyphen2, SIFT, FATHMM-MKL, MetaSVM y MetaLR (150) la catalogan como tolerada. No hay estudios funcionales que hayan evaluado el impacto de esta variante sobre el receptor. *Miraoui et al* (118) estudiaron una muestra de pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico congénito y en dos pacientes de los 350 estudiados, fenotipo “contrario” al presente en nuestra paciente, encontraron esta variante en compañía de otra variante en otro gen relacionado con el hipogonadismo. Así, en un paciente masculino con fenotipo compatible con síndrome de Kallmann esta variante acompañaba a la variante en hemicigosis en *ANOS1*: NM\_000216.4: c.571C>T; NP\_000207.2:p.Arg191\*, esta última catalogada como patogénica y que por sí sola explicaba el fenotipo. En el otro individuo se sexo femenino con fenotipo de HHPc sin afectación del olfato encontraron esta variante acompañando a la variante en heterocigosis en *SPRY4* NM\_030964.3:c.722C>A; NP\_001280219.1:p.Ser241Tyr, catalogada como factor de riesgo para HHPc. Con estos datos de frecuencia poblacional y conociendo que se ha asociado a pacientes con retraso de la pubertad y no adelanto, concluimos que esta variante no debe ser causante de ninguna alteración funcional importante en el receptor, aunque para poder demostrarlo con seguridad sería necesario realizar estudios funcionales.

### Otros genes analizados por NGS incluidos en el primer y segundo filtrado

Gen *KISS1R*: En el receptor de kipeptina 1 no hemos encontrado ninguna variante que pueda ser catalogada como patogénica, probablemente patogénica o de significado incierto, lo que concuerda con lo reportado por otros autores (13,64,65).

Gen *TAC3*: En el gen codificante de neurokinina B no hemos encontrado ninguna variante que pueda ser catalogada como patogénica, probablemente patogénica o de significado incierto, a pesar de ser un gen candidato por su estrecha relación con el inicio puberal.

Gen *LIN28B*: no encontramos ninguna variante en la región codificante. Esto concuerda con la experiencia de otros grupos (151,152), que tras estudiar la región codificante de *LIN28B* en sendas series de pacientes con PPCI, sólo encontraron una variante de cambio de sentido en región codificante de baja frecuencia poblacional, cuya frecuencia alélica en grupos de pacientes y grupos control no fue estadísticamente distinta. Sabemos que la relación de este gen con el inicio puberal se realiza a través del control de la producción de la familia let-7 de miRNA, por lo que quizás su relación con la patología puberal pudiese estar relacionada con la disregulación de su expresión, fenómeno que puede ser causado por variantes en zonas reguladoras, alteración de la configuración de la cromatina en la región promotora del gen, entre otros. Por ello, pensamos que son necesarios nuevos estudios orientados a evaluar estas posibilidades.

Gen *FSHR*: en una paciente caucásica encontramos la variante NM\_000145: c.1878T>C; NP\_000136:p.Tyr626= en heterocigosis en el gen *FSHR*. Este gen codifica para el receptor de FSH, cuyas variantes patogénicas se han relacionado con fallo ovárico prematuro y síndrome de hiperestimulación ovárica (23). La variante encontrada es sinónima y, ha sido descrita en las bases de datos poblacionales con el número rs114297239. En gnomAD tiene una frecuencia poblacional de  $7,97 \times 10^{-6}$ . Los predictores de afectación del *splicing*: Human Splicing Finder(153) y el paquete de análisis del *splicing* del programa Alamut® no detectaron que hubiese alteración potencial del *splicing* por la presencia de esta variante. Por todo esto consideramos esta variante como probablemente benigna, a pesar de su baja frecuencia poblacional.

Gen *DLK1*: este gen fue estudiado en nuestra cohorte utilizando la técnica de secuenciación Sanger puesto que este gen no se encuentra incluido en el kit de captura *True Sight One*® utilizado para el análisis del exoma clínico de nuestros pacientes. El resultado del análisis de la región codificante de este gen no puso en evidencia ninguna variante que pudiese ser clasificada como patogénica, probablemente patogénica o de

significado clínico incierto. También se analizó la presencia de variantes de número de copia, utilizando la técnica de MLPA con el kit ME-032. Como limitación de este estudio debemos resaltar que este kit contiene una sonda en el exón 3 y otra en el exón 4 del gen *DLK1*, por lo que deleciones/duplicaciones presentes en otras regiones del gen no serían susceptibles de ser detectadas con la metodología utilizada. Por ejemplo, el reordenamiento descrito por *Dauber et al* (51) que incluía la delección del primer exón y la inserción de un segmento del intrón 3.

Por último, para descartar la disomía uniparental (DUP) materna del cromosoma 14 citobanda 14q32.2, relacionada al síndrome de Temple, se realizó tanto el estudio de haplotipos construidos mediante el genotipado de STRs ubicados en la citobanda 14q32, como el análisis del patrón de metilación de los genes *MEG3*, *MIR380* y *DLK1* ubicados en la región improntada del cromosoma 14. En nuestra serie sólo 3 pacientes presentaban al menos una característica adicional a la PPC relacionada a este síndrome, como es la obesidad. En los 29 pacientes estudiados mediante la técnica de MLPA con el kit ME-032 se obtuvo un patrón de metilación normal, y de los 28 estudiados con STRs en 26 pudimos descartar la presencia de DUP materna, en dos de las familias estudiadas los resultados no fueron informativos, ver figura 15 apartados C) y D) página 86. Ninguna de las dos pacientes presentaba alteración del patrón de metilación del cromosoma 14, tampoco presentaban obesidad, su IMC era de -0,1 SDS y -0,8SDS, respectivamente; ni presentaron signos adicionales de síndrome de Temple. Con todo esto concluimos que ninguno de los 29 pacientes estudiados presentaban una disomía uniparenta materna del cromosoma 14.

En el resto de los genes estudiados no encontramos ninguna variante que pudiese ser catalogada como patogénica, probablemente patogénica o de significado clínico incierto.

En vista de los resultados obtenidos concluimos que la prueba más rentable para el diagnóstico genético en pacientes con PPCI, con o sin antecedente familiar, es la secuenciación por técnica de Sanger del gen *MKRN3*.

## Grupo HHPc

En este grupo se obtuvo una rentabilidad diagnóstica global de 43%, lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía (8,109,121) donde se describe que la rentabilidad del estudio genético en pacientes con HHPc se encuentra alrededor del 50%.

En dos de los tres pacientes en los que el resultado fue concluyente, los hallazgos se encontraron en:



- Gen *SOX10*: en un paciente con fenotipo de síndrome Kallmann (17-3252) aparentemente esporádico, se encontró una variante de cambio de marco de lectura con aparición de un codón de parada prematuro, que no ha sido reportada previamente como causante de enfermedad en las bases de datos consultadas (HGMD profesional, ClinVar). Teniendo en cuenta que otras variantes que ocasionan un cambio de marco de lectura han sido clasificadas como patogénicas, la catalogamos como probablemente patogénica. Para poder catalogarla como patogénica sería necesario realizar un estudio funcional o al menos demostrar que se trata de una variante *de novo*. Al no contar con muestra de los progenitores no pudimos realizar la segregación de dicha variante. En el segundo paciente (13-2928) con fenotipo HHPc sin alteración del olfato y con un antecedente familiar del padre con pubertad “algo tardía”, encontramos una variante de cambio de sentido que no ha sido descrita en las bases de datos poblacionales ni ha sido documentada como causante de enfermedad, pero se encuentra ubicada en el dominio de la proteína que se une al ADN y otras variantes de cambio de sentido en este dominio han sido reportadas como patogénicas. De los programas de predicción *in silico* consultados: SIFT, Polyphen2, FATHMM, predicen que este cambio no sería tolerado. Por todo esto la catalogamos como probablemente patogénica. Llama la atención que esta variante fue encontrada en un paciente sin alteración del olfato, y con antecedentes familiares poco esclarecedores. Al no contar con las muestras de los progenitores no pudimos verificar si la variante era heredada o *de novo*.
- Gen *ANOS1*: en el paciente JLDM con fenotipo de SK y antecedente familiar de un tío materno con trastorno puberal encontramos una variante que cambia el patrón de lectura con la aparición de un codón de parada prematuro. Aunque esta variante no había sido descrita como patogénica, se interpretó como tal, puesto que otras variantes de cambio de patrón de lectura han sido reportadas como patogénicas. La segregación de esta variante puso en evidencia que se trataba de una variante *de novo* por lo que el antecedente familiar referido no puede ser explicado por esta variante.

En dos de los tres pacientes en los que el resultado no fue concluyente encontramos variantes en heterocigosis en el gen *NSMF* y *CHD7* y en el tercer paciente (18-0491) una variante en el gen *SEMA3A*.

- Gen *NSMF*: en un paciente con fenotipo de SK (18-3230) se encontró una variante de cambio de sentido que no ha sido descrita en las bases de datos poblacionales y tampoco ha sido documentada como causante de enfermedad. Asimismo, no está ubicada en ningún dominio funcional de la proteína. Por todo ello se interpretó como variante de significado incierto y al no encontrarse una variante en algún otro gen implicado en la herencia oligogénica asociada a HHPc, tanto puntual como CNV y al no contar con muestras de progenitores para su segregación y por el hecho de que este gen presenta penetrancia incompleta se determinó que el estudio no era concluyente. En un segundo paciente con fenotipo SK (17-3285) encontramos una variante de cambio de sentido, ubicada en la segunda posición del sitio aceptor del *splicing* del exón 9. El programa Human Splicing Finder nos muestra que esta variante podría alterar el *splicing* del exón 9 por lo que podría dar lugar a un *splicing* aberrante, que podría o no afectar la función de la proteína. Esta variante no ha sido descrita en las bases de datos poblacionales y tampoco ha sido descrita como causante de enfermedad, por lo que concluimos que es una variante probablemente patogénica, pero al no encontrar una segunda variante algún otro gen implicado en la herencia oligogénica asociada a HHPc, tanto puntual como CNV, ni contar con las muestras de los padres para la segregación de esta variante y por el hecho de que este gen presenta penetrancia incompleta se determinó que el estudio no era concluyente.
- Gen *CHD7*: en el paciente 18-3230 con fenotipo de SK y criptorquidia sin otra sintomatología compatible con síndrome de CHARGE se encontró una variante de cambio de sentido que no ha sido descrita en las bases de datos poblacionales y tampoco ha sido documentada como causante de enfermedad. Esta variante se encuentra ubicada en el dominio helicasa de la proteína; por todo esto debe ser interpretada como de significado incierto. Es de notar que no se ha descrito para este gen la herencia oligogénica por lo que no podemos relacionar la presencia de esta variante y de la variante presente en *NSMF* en este paciente.
- Gen *SEMA3A*: en el paciente 18-0491, con fenotipo SK y antecedentes familiares de un tío materno con alteraciones de la fertilidad, se encontró una variante de cambio de sentido en heterocigosis descrita en la población general con una frecuencia de 0,014 (gnomAD). También ha sido relacionada con HHPc, pero sólo en pacientes con una variante patogénica en otro de los

genes implicados en HHPc (*PROK2*, *PROKR2*, *FGFR1*) (142). Por tanto, el estudio no es concluyente.

En el resto de los genes no encontramos variantes que pudiésemos catalogar como causantes de enfermedad. Llama la atención que no encontramos ningún paciente con alteraciones en *FGFR1* o *GNRHR*, ya que son los genes más frecuentemente implicados, junto con *ANOS1* en la etiología del HHPc. Esto podría estar relacionado con el pequeño tamaño muestral.

En nuestra serie, el análisis de los genes relacionados con el hipogonadismo hipogonadotropo se realizó basándonos en el estudio del exoma clínico, que nos permitió el análisis y reanálisis de las muestras utilizando diferentes filtrados de paneles virtuales. Estos paneles se diseñaron orientados por el fenotipo del paciente: presentación sindrómica (obesidad o malformaciones), síndrome Kallmann o hipogonadismo hipogonadotropo permanente congénito sin alteración del olfato, como se describió en la metodología. Sin embargo, una de las principales limitaciones fue que no pudieron analizarse todos los genes relacionados con el SK y HHPc, puesto que no estaban incluidos en el kit de captura *Clinical Exome Solution\_v.2* de Sophia Genetics.

Los 15 genes no incluidos en este kit fueron:

- Genes relacionados con síndrome de Kallmann:  
*CCDC141* (OMIM#616031;2q31.2), *DUSP6* (OMIM# 602748;12q21.33), *FEZF1* (OMIM# 613301;7q31.32), *FGF17* (OMIM# 603725;8p21.3), *FLRT3* (OMIM# 604808;20p12.1), *HS6ST1* (OMIM# 604846;2q14.3), *IL17RD* (OMIM# 606807;3p14.3) y *KLB* (OMIM# 611135;4p14).
- Gen relacionado con HHPc sin alteración del olfato:  
*IGSF10* (OMIM# 617351;3q25.1).
- Genes relacionados con hipogonadismo hipogonadotrópico sindrómico:  
*DMXL2* (OMIM#612186; 15q21.2), *OTUD4* (OMIM# 611744;4q31.21), *POLR3A* (OMIM# 614258;10q22.3), *RNF216* (OMIM# 609948;7p22.1), *STUB1* (OMIM# 607207;16p13.3) y *TBC1D20* (OMIM# 611663;20p13).

De éstos, destacan por su importancia *IL17RD* y *FGF17* que, aunque minoritarios representan en conjunto un 3% de las causas del HHPc (118).

Por todo esto no podemos descartar que los tres pacientes estudiados con hallazgos no concluyentes presenten otra variante necesaria para explicar la etiopatogenia del HHPc en alguno de los genes no estudiados. Por otro lado, la cobertura

de casi todos los genes fue óptima, exceptuando el caso de *ANOS1*, transcrito NM\_000216, en el que no hubo lecturas para los exones 10, 12 y 14. En la base de datos ClinVar está descrita una variante probablemente patogénica en el gen 10. Esta falta de cobertura se observó en todas las muestras estudiadas, por lo que deducimos que se trata de una falla en el diseño del kit de captura utilizado, en este caso CES. En el caso negativo y los tres casos no concluyentes podría plantearse la secuenciación por Sanger de los exones no analizados. Sobre todo, en los casos 18-1298 y 18-3230 que presentaban microsmia.

Otra limitación fue no tener disponible la muestra de los progenitores de 6 de los 7 pacientes, puesto que la segregación de las variantes hubiese podido ayudar a la categorización de las variantes de significado clínico incierto y hubiese dado información muy importante de cara al asesoramiento genético en los casos positivos 17-3252 y 13-2928.

Por otro lado, es importante hacer notar que diferentes kits de captura del exoma clínico incluyen diferentes genes, este dato lo debemos tener en cuenta al solicitar este tipo de estudio para poder calcular la sensibilidad del estudio. En vista de esta limitación del estudio del HHPc basándonos en el análisis del exoma clínico, que no incluye en su totalidad los genes relacionados con el HHPc, se sugieren dos alternativas para el estudio por secuenciación masiva:

- Diseño de un kit de captura de un panel de genes que incluya todos los genes relacionados con la patología, con la desventaja de que con el paso del tiempo quizás se descubran nuevos genes relacionados con HHPc, lo que dejaría obsoleto dicho panel. Pero con la ventaja de que el costo sería menor, las coberturas individuales de los genes podrían ser óptimas y se disminuiría la posibilidad de encontrar hallazgos no buscados.
- Utilizar como kit de captura el exoma completo (WES) o exoma clínico, lo que permitiría realizar el filtrado de genes con un panel virtual que puede actualizarse sin tener que volver a secuenciar la muestra. Pero con las desventajas de un coste mayor, la falta de cobertura para algunos genes en el caso del exoma clínico, una cobertura individual de cada gen que podría ser subóptima y la posibilidad de encontrar hallazgos no buscados, cuya posibilidad debe ser discutida en el ámbito de una consulta de Asesoramiento Genético, para ser informados o no según la decisión del paciente o sus cuidadores.

La decisión de tomar una u otra alternativa dependerá de las disponibilidades de cada centro. Se debe tomar en cuenta que distintos kits de captura para el exoma clínico incluyen diferentes genes y ofrecen diferentes coberturas individuales de los mismos, por lo que la sensibilidad con uno u otro kit podría variar.

Conocer en detalle las bases moleculares de la pubertad nos permitirá dilucidar mejor las causas de sus alteraciones, con lo que podremos dar una respuesta más específica a los pacientes con estas alteraciones, puesto que ahora mismo las opciones terapéuticas, aunque efectivas, sobre todo en el caso de la PPCI, son limitadas. Así pues, al entender el proceso puberal en profundidad quizás nos ayude a descubrir nuevas dianas terapéuticas para estos pacientes.

## Futuro del estudio de la patología puberal

Apoyándonos en los resultados obtenidos, así como los obtenidos por otros grupos, pareciera que en la patología puberal, sobre todo la PPCI, los cambios monogénicos no son suficientes para desencadenar alteraciones clínicamente significativas. Esto puede explicarse porque el proceso puberal, al ser un hito biológico de gran importancia y ser influenciado por múltiples sistemas de control, no es suficiente con la disfunción de un solo factor para alterar el proceso en su totalidad, exceptuando la situación en la que se altera un proceso de importancia crítica, como puede ser la llegada de las neuronas productoras de GnRH a su destino anatómico o la alteración de una proteína de control de gran jerarquía, como es el caso de *MKRN3*.

Además, en vista de que esta maquinaria hormonal recibe diferentes aferencias del estado metabólico del individuo es lógico pensar que defectos epigenéticos pudieran explicar de manera mayoritaria las alteraciones del proceso puberal. De hecho, en los últimos años, se han ido acumulando evidencias sobre la influencia de estos mecanismos epigenéticos en la puesta en marcha del proceso puberal (5,12,32,35,81). Así, estos mecanismos serían los candidatos ideales por su heredabilidad y reversibilidad, y por su relación con procesos metabólicos que se ven afectados por factores ambientales como la dieta y stress.

Por lo que, para poder avanzar en los estudios de la patología puberal, primero debemos comprender el funcionamiento de estos mecanismos epigenéticos y las posibles fuentes de su alteración. Este tipo de estudios ya se están realizando en otras especies de mamíferos, puesto que el estudio en seres humanos tiene la limitación de que el análisis de los cambios epigenéticos es dinámico y tejido-dependiente, por lo que la aproximación posible a través del análisis del ADN, ARN o cromatina proveniente de

células de la sangre o célula epiteliales puede ser no representativa de los núcleos hipotalámicos involucrados en la pubertad. Aun así, merece la pena analizar las diferencias de las marcas epigenéticas en distintos momentos de la vida, pre-puberal, puberal y post-puberal, así como la comparación de estas “marcas” epigenéticas en pacientes con alteraciones de la pubertad, bien sea PPCI o HHPc.

## Conclusiones

- 1) En nuestra serie de pacientes con PPCI, la prevalencia de alteraciones en genes relacionados con la expresión de GnRH ha resultado relativamente baja y el único gen implicado ha sido *MKRN3*. Por tanto, para este tipo de pacientes, el estudio del gen *MKRN3* mediante secuenciación Sanger es el que presenta mejor coste-efectividad.
- 2) Este estudio resulta de mayor utilidad para el análisis de casos familiares, particularmente, en los que se tenga constancia de afectación en línea paterna. Por el momento, no es recomendable su inclusión como herramienta diagnóstica en la evaluación de casos de PPCI esporádicos.
- 3) La frecuencia de alteraciones genéticas en los pacientes con HHPc es notablemente superior a la encontrada en pacientes con PPCI. Así pues, el estudio genético de los pacientes con HHPc no sindrómicos debe abordarse mediante técnicas de secuenciación masiva en sus diferentes aplicaciones, ya sea a través de paneles dirigidos o de exoma filtrado por genes candidatos.
- 4) En los pacientes con HHPc, debemos ser especialmente cautos en la interpretación de las variantes de significado clínico incierto, puesto que el mecanismo de producción de la patología puede ser oligogénico.
- 5) El filtrado preferencial por genes relacionados con la presencia o ausencia de alteración del olfato en pacientes con HHPc, no parece aportar más especificidad diagnóstica, puesto que muchos de los genes pueden ocasionar fenotipos solapantes.
- 6) Para poder analizar la relación genotipo/fenotipo en pacientes con PPCI e HHPc es necesario aumentar el número de individuos caracterizados molecularmente.
- 7) El resultado del estudio genético de los pacientes con PPCI e HHPc en la mayoría de los casos ha resultado no informativo. Por lo tanto, el asesoramiento genético debe sustentarse en el análisis de la información de los antecedentes personales y familiares de los pacientes, así como de la evolución clínica de los mismos hasta la etapa adulta.



## **Referencias bibliográficas**

- (1) Soriano-Guillén L, Argente J. Central precocious puberty: epidemiology, etiology, diagnosis and treatment. *An Pediatr (Barc)* 2011 May;74(5):336.e13.
- (2) Soriano Guillén L. Pubertad normal y variantes de la normalidad. *Pediatr Integral* 2015;XIX(6):380-8.
- (3) Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970 Feb;45(239):13-23.
- (4) Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969 Jun;44(235):291-303.
- (5) Lomniczi A, Ojeda SR. The Emerging Role of Epigenetics in the Regulation of Female Puberty. *Endocr Dev* 2016;29:1-16.
- (6) Teixeira L, Guimiot F, Dodé C, Fallet-Bianco C, Millar RP, Delezoide AL, et al. Defective migration of neuroendocrine GnRH cells in human arrhinencephalic conditions. *J Clin Invest* 2010 Oct;120(10):3668-72.
- (7) Kaprara A, Huhtaniemi IT. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism* 2018 Sep;86:3-17.
- (8) Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, de Roux N, Dodé C, Dunkel L, et al. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2015 Sep;11(9):547-64.
- (9) Millar RP, Tello JA. Chapter 115 - Gonadotropin-Releasing Hormones. En: Jameson JL, De Groot LJ, de Kretser DM, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, et al, editors. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)* 2016:2003-22.e7.
- (10) Anne Finlayson C, Styne DM, Larry Jameson J. Chapter 120 - Endocrinology of Sexual Maturation and Puberty\*. En: Jameson JL, De Groot LJ, de Kretser DM, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, et al, editors. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)* Philadelphia: W.B. Saunders; 2016. p. 2119-29.e2.
- (11) Ortiz Cabrera NV. Pubertad Precoz Central ¿genética o ambiente? En: Daschner A, Gomez Perez JL, Trujillo Tiebas MJ, editors. *Medicina Evolucionista Aportaciones pluridisciplinares Volumen IV: MedEvo*; 2018. p. 99-108.
- (12) Lomniczi A, Wright H, Ojeda SR. Epigenetic regulation of female puberty. *Front Neuroendocrinol* 2015 Jan;36:90-107.
- (13) Leka-Emiri S, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. The mystery of puberty initiation: genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (ICPP). *J Endocrinol Invest* 2017 Aug;40(8):789-802.
- (14) Javed Z, Qamar U, Sathyapalan T. The role of kisspeptin signalling in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis--current perspective. *Endokrynol Pol* 2015;66(6):534-47.
- (15) Cortés ME, Carrera B, Rioseco H, Pablo del Río J, Vigil P. The Role of Kisspeptin in the Onset of Puberty and in the Ovulatory Mechanism: A Mini-review. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2015 Oct;28(5):286-91.

- (16) Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012 Jul;92(3):1235-316.
- (17) Garcia JP, Guerriero KA, Keen KL, Kenealy BP, Seminara SB, Terasawa E. Kisspeptin and Neurokinin B Signaling Network Underlies the Pubertal Increase in GnRH Release in Female Rhesus Monkeys. *Endocrinology* 2017 Oct 1;158(10):3269-80.
- (18) Kanda S, Oka Y. Structure, synthesis, and phylogeny of kisspeptin and its receptor. *Adv Exp Med Biol* 2013;784:9-26.
- (19) Avendaño MS, Vazquez MJ, Tena-Sempere M. Disentangling puberty: novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty. *Hum Reprod Update* 2017 Nov 1;23(6):737-63.
- (20) Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2012 Feb 16;366(7):629-35.
- (21) Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LF, Jorge AA, Brito VN, et al. Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2012 Dec;56(9):646-52.
- (22) Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009 Mar;41(3):354-8.
- (23) Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), [citado el 5 de marzo de 2019]. Recuperado de: <https://omim.org/>
- (24) Nakahara T, Uenoyama Y, Iwase A, Oishi S, Nakamura S, Minabe S, et al. Chronic peripheral administration of kappa-opioid receptor antagonist advances puberty onset associated with acceleration of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. *J Reprod Dev* 2013 Oct;59(5):479-84.
- (25) Tomikawa J, Uenoyama Y, Ozawa M, Fukanuma T, Takase K, Goto T, et al. Epigenetic regulation of Kiss1 gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 May 15;109(20):1294-301.
- (26) Kauffman AS, Gottsch ML, Roa J, Byquist AC, Crown A, Clifton DK, et al. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 2007 Apr;148(4):1774-83.
- (27) Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* 2001 Feb;22(1):111-51.
- (28) Zheng SX, Bosch MA, Ronnekleiv OK. mu-opioid receptor mRNA expression in identified hypothalamic neurons. *J Comp Neurol* 2005 Jul 4;487(3):332-44.
- (29) Lomniczi A, Wright H, Castellano JM, Sonmez K, Ojeda SR. A system biology approach to identify regulatory pathways underlying the neuroendocrine control of female puberty in rats and nonhuman primates. *Horm Behav* 2013 Jul;64(2):175-86.
- (30) Mueller JK, Dietzel A, Lomniczi A, Loche A, Tefs K, Kiess W, et al. Transcriptional regulation of the human KISS1 gene. *Mol Cell Endocrinol* 2011 Aug 6;342(1-2):8-19.

- (31) Hu Z, Chen R, Cai C. Association of genetic polymorphisms around the LIN28B gene and idiopathic central precocious puberty risks among Chinese girls. *Pediatr Res* 2016 Oct;80(4):521-5.
- (32) Toro CA, Wright H, Aylwin CF, Ojeda SR, Lomniczi A. Trithorax dependent changes in chromatin landscape at enhancer and promoter regions drive female puberty. *Nat Commun* 2018 Jan 4;9(1):57.
- (33) Kurian JR, Terasawa E. Epigenetic control of gonadotropin releasing hormone neurons. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:61.
- (34) Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* 2016 08;17(8):487-500.
- (35) Vazquez MJ, Toro CA, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Roa J, Beiroa D, et al. SIRT1 mediates obesity- and nutrient-dependent perturbation of pubertal timing by epigenetically controlling Kiss1 expression. *Nature communications* 2018 Oct 10;9(1):4194.
- (36) Messina A, Langlet F, Chachlaki K, Roa J, Rasika S, Jouy N, et al. A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty. *Nat Neurosci* 2016 06;19(6):835-44.
- (37) Teresa Gavela Pérez. Garcés-Segura C (dir), Soriano Guillén L (dir). Análisis de la influencia de factores nutricionales y bioquímicos sobre la edad de la menarquia. [tesis doctoral]. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid; 2015.
- (38) Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty: roles of leptin and kisspeptins. *Horm Behav* 2013 Jul;64(2):187-94.
- (39) Argente-Arizon P, Castro-Gonzalez D, Diaz F, Fernandez-Gomez MJ, Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M, et al. Neonatal Overnutrition Increases Testicular Size and Expression of Luteinizing Hormone beta-Subunit in Peripubertal Male Rats. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018 Apr 13;9:168.
- (40) Bohlen TM, Silveira MA, Zampieri TT, Frazão R, Donato J. Fatness rather than leptin sensitivity determines the timing of puberty in female mice. *Mol Cell Endocrinol* 2016;423:11-21.
- (41) Reinehr T, Roth CL. Is there a causal relationship between obesity and puberty? *Lancet Child Adolesc Health* 2019 Jan;3(1):44-54.
- (42) Leshan RL, Pfaff DW. The hypothalamic ventral premammillary nucleus: A key site in leptin's regulation of reproduction. *J Chem Neuroanat* 2014 Nov;61-62:239-47.
- (43) Ohman-Hanson RA, Cree-Green M, Kelsey MM, Bessesen DH, Sharp TA, Pyle L, et al. Ethnic and Sex Differences in Adiponectin: From Childhood to Adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 2016 12;101(12):4808-15.
- (44) Sitticharoon C, Sukharomana M, Likitmaskul S, Churintaraphan M, Maikaew P. Increased high molecular weight adiponectin, but decreased total adiponectin and kisspeptin, in central precocious puberty compared with aged-matched prepubertal girls. *Reprod Fertil Dev* 2017 Nov;29(12):2466-78.

- (45) Wen J, Liu C, Bi W, Hu Y, Chen Q, Huang H, et al. Adiponectin inhibits KISS1 gene transcription through AMPK and specificity protein-1 in the hypothalamic GT1-7 neurons. *J Endocrinol* 2012 Aug;214(2):177-89.
- (46) Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000 Nov;141(11):4255-61.
- (47) Tena-Sempere M. Ghrelin, the gonadal axis and the onset of puberty. *Endocr Dev* 2013;25:69-82.
- (48) Soriano-Guillén L, Barrios V, Chowen JA, Sanchez I, Vila S, Quero J, et al. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *J Pediatr* 2004 Jan;144(1):30-5.
- (49) Motta G, Allasia S, Ghigo E, Lanfranco F. Ghrelin Actions on Somatotropic and Gonadotropic Function in Humans. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2016;138:3-25.
- (50) Gomes LG, Cunha-Silva M, Crespo RP, Ramos CO, Montenegro LR, Canton A, et al. DLK1 is a novel link between reproduction and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2018 Nov 19.
- (51) Dauber A, Cunha-Silva M, Macedo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, et al. Paternally Inherited DLK1 Deletion Associated With Familial Central Precocious Puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2017 May 1;102(5):1557-67.
- (52) Soriano-Guillén L, Argente J. Central precocious puberty, functional and tumor-related. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2019 Jan 22,.
- (53) Carel JC, Leger J. Clinical practice. Precocious puberty. *N Engl J Med* 2008 May 29;358(22):2366-77.
- (54) Sørensen K, Mouritsen A, Aksglaede L, Hagen CP, Mogensen SS, Juul A. Recent secular trends in pubertal timing: implications for evaluation and diagnosis of precocious puberty. *Horm Res Paediatr* 2012;77(3):137-45.
- (55) Euling SY, Herman-Giddens ME, Lee PA, Selevan SG, Juul A, Sørensen TIA, et al. Examination of US puberty-timing data from 1940 to 1994 for secular trends: panel findings. *Pediatrics* 2008 Feb;121 Suppl 3:S172-91.
- (56) Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, Bourdony CJ, Bhapkar MV, Koch GG, et al. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. *Pediatrics* 1997 Apr;99(4):505-12.
- (57) Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016 Mar;4(3):265-74.
- (58) Soriano-Guillén LS, Martínez-Villanueva J, Gavela-Pérez T, Corredor-Andrés B, Muñoz-Calvo MT. Alteraciones nutricionales y endocrinológicas del adolescente. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 2018;12(61):3562-76.
- (59) Chen M, Eugster EA. Central Precocious Puberty: Update on Diagnosis and Treatment. *Paediatr Drugs* 2015 Aug;17(4):273-81.
- (60) Soriano-Guillén L, Corripio R, Labarta JI, Canete R, Castro-Feijóo L, Espino R, et al. Central precocious puberty in children living in Spain: incidence, prevalence, and influence of adoption and immigration. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 Sep;95(9):4305-13.

- (61) de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Apr;89(4):1794-800.
- (62) Ortiz-Cabrera NV, Riveiro-Álvarez R, Lopez-Martínez MA, Pérez-Segura P, Aragón-Gómez I, Trujillo-Tiebas MJ, et al. Clinical Exome Sequencing Reveals MKRN3 Pathogenic Variants in Familial and Nonfamilial Idiopathic Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr* 2017;87(2):88-94.
- (63) Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 2008 Feb 14;358(7):709-15.
- (64) Oh YJ, Rhie YJ, Nam HK, Kim HR, Lee KH. Genetic Variations of the KISS1R Gene in Korean Girls with Central Precocious Puberty. *J Korean Med Sci* 2017 Jan;32(1):108-14.
- (65) Krstevska-Konstantinova M, Jovanovska J, Tasic VB, Montenegro LR, Beneduzzi D, Silveira LF, et al. Mutational analysis of KISS1 and KISS1R in idiopathic central precocious puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2014 Jan;27(1-2):199-201.
- (66) Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 May;95(5):2276-80.
- (67) Mazaheri A, Hashemipour M, Salehi M, Behnam M, Hovsepian S, Hassanzadeh A. Mutation of kisspeptin 1 gene in children with precocious puberty in isfahan city. *Int J Prev Med* 2015;6:41.
- (68) Rhie YJ, Lee KH, Ko JM, Lee WJ, Kim JH, Kim H. KISS1 gene polymorphisms in Korean girls with central precocious puberty. *J Korean Med Sci* 2014 Aug;29(8):1120-5.
- (69) Zhang Y, Zhang H, Qin Y, Zhang Y, Chen X, Li W, et al. Mutations in KISS1 are not responsible for idiopathic hypogonadotropic hypogonadism in Chinese patients. *J Assist Reprod Genet* 2015 Mar;32(3):375-378.
- (70) Huijbregts L, Roze C, Bonafe G, Houang M, Le Bouc Y, Carel JC, et al. DNA polymorphisms of the KISS1 3' untranslated region interfere with the folding of a G-rich sequence into G-quadruplex. *Mol Cell Endocrinol* 2012 Apr 04;351(2):239-48.
- (71) Huppert JL, Bugaut A, Kumari S, Balasubramanian S. G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Res* 2008 Nov;36(19):6260-8.
- (72) Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med* 2013 Jun 27;368(26):2467-75.
- (73) Behrends C, Harper JW. Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nat Struct Mol Biol* 2011 May;18(5):520-8.
- (74) Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 2009;78:399-434.
- (75) Gray TA, Hernandez L, Carey AH, Schaldach MA, Smithwick MJ, Rus K, et al. The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C(3)H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. *Genomics* 2000 May 15;66(1):76-86.
- (76) Abreu AP, Macedo DB, Brito VN, Kaiser UB, Latronico AC. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. *J Mol Endocrinol* 2015 Jun;54(3):131.

- (77) Schreiner F, Gohlke B, Hamm M, Korsch E, Woelfle J. MKRN3 mutations in familial central precocious puberty. *Horm Res Paediatr* 2014;82(2):122-6.
- (78) Bulcao Macedo D, Nahime Brito V, Latronico AC. New causes of central precocious puberty: the role of genetic factors. *Neuroendocrinology* 2014;100(1):1-8.
- (79) Kanber D, Giltay J, Wieczorek D, Zogel C, Hochstenbach R, Caliebe A, et al. A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009 May;17(5):582-90.
- (80) Liu H, Kong X, Chen F. Mkrn3 functions as a novel ubiquitin E3 ligase to inhibit Nptx1 during puberty initiation. *Oncotarget* 2017 Jul 18;8(49):85102-9.
- (81) Aylwin CF, Vigh-Conrad K, Lomniczi A. The Emerging Role of Chromatin Remodeling Factors in Female Pubertal Development. *Neuroendocrinology* 2019.
- (82) Lee HS, Jin HS, Shim YS, Jeong HR, Kwon E, Choi V, et al. Low Frequency of MKRN3 Mutations in Central Precocious Puberty Among Korean Girls. *Horm Metab Res* 2016 Feb;48(2):118-22.
- (83) Simon D, Ba I, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, et al. Mutations in the maternally imprinted gene MKRN3 are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol* 2016 Jan;174(1):1-8.
- (84) Grandone A, Cantelmi G, Cirillo G, Marzuillo P, Luongo C, Miraglia del Giudice E, et al. A case of familial central precocious puberty caused by a novel mutation in the makorin RING finger protein 3 gene. *BMC Endocr Disord* 2015 Oct 23;15:8.
- (85) Kansäkoski J, Raivio T, Juul A, Tommiska J. A missense mutation in MKRN3 in a Danish girl with central precocious puberty and her brother with early puberty. *Pediatr Res* 2015 Dec;78(6):709-11.
- (86) Neocleous V, Shammas C, Phelan MM, Nicolaou S, Phylactou LA, Skordis N. In silico analysis of a novel MKRN3 missense mutation in familial central precocious puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2016 Jan;84(1):80-4.
- (87) Settas N, Dacou-Voutetakis C, Karantza M, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Voutetakis A. Central precocious puberty in a girl and early puberty in her brother caused by a novel mutation in the MKRN3 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 Apr;99(4):E647-51.
- (88) de Vries L, Gat-Yablonski G, Dror N, Singer A, Phillip M. A novel MKRN3 missense mutation causing familial precocious puberty. *Hum Reprod* 2014 Dec;29(12):2838-43.
- (89) Aycan Z, Savas-Erdeve S, Cetinkaya S, Kurnaz E, Keskin M, Muratoglu Sahin N, et al. Investigation of MKRN3 Mutation in Patients with Familial Central Precocious Puberty. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2018 Jul 31;10(3):223-9.
- (90) Grandone A, Capristo C, Cirillo G, Sasso M, Umano GR, Mariani M, et al. Molecular Screening of MKRN3, DLK1, and KCNK9 Genes in Girls with Idiopathic Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr* 2017;88(3-4):194-200.
- (91) Nishioka J, Shima H, Fukami M, Yatsuga S, Matsumoto T, Ushijima K, et al. The first Japanese case of central precocious puberty with a novel MKRN3 mutation. *Hum Genome Var* 2017;4:17017.



- (92) Macedo DB, Abreu AP, Reis AC, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, et al. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(6):E1097-103.
- (93) Macedo DB, Franca MM, Montenegro LR, Cunha-Silva M, Best DS, Abreu AP, et al. Central Precocious Puberty Caused by a Heterozygous Deletion in the MKRN3 Promoter Region. *Neuroendocrinology* 2018;107(2):127-32.
- (94) Christoforidis A, Skordis N, Fanis P, Dimitriadou M, Sevastidou M, Phelan MM, et al. A novel MKRN3 nonsense mutation causing familial central precocious puberty. *Endocrine* 2017 May;56(2):446-9.
- (95) Lu W, Wang J, Li C, Sun M, Hu R, Wang W. A novel mutation in 5'-UTR of Makorin ring finger 3 gene associated with the familial precocious puberty. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2018;50(12):1291-3.
- (96) Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJ, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet* 2014 Aug;51(8):495-501.
- (97) Zechner U, Kohlschmidt N, Rittner G, Damatova N, Beyer V, Haaf T, et al. Epimutation at human chromosome 14q32.2 in a boy with a upd(14)mat-like clinical phenotype. *Clin Genet* 2009 Mar;75(3):251-8.
- (98) Palmert MR, Hirschhorn JN. Genetic approaches to stature, pubertal timing, and other complex traits. *Mol Genet Metab* 2003;80(1-2):1-10.
- (99) Bayley N, Pinneau SR. Tables for predicting adult height from skeletal age: revised for use with the Greulich-Pyle hand standards. *J Pediatr* 1952 Apr;40(4):423-41.
- (100) Aguirre RS, Eugster EA. Central precocious puberty: From genetics to treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2018 Aug;32(4):343-54.
- (101) Carel J, Lahlou N, Roger M, Chaussain JL. Precocious puberty and statural growth. *Hum Reprod Update* 2004 Mar-Apr;10(2):135-47.
- (102) Yoo JH. Effects of early menarche on physical and psychosocial health problems in adolescent girls and adult women. *Korean J Pediatr* 2016 Sep;59(9):355-61.
- (103) Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol* 2012 Nov;13(11):1141-51.
- (104) Gong TT, Wang YL, Ma XX. Age at menarche and endometrial cancer risk: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Sci Rep* 2015 Sep 11;5:14051.
- (105) Lakshman R, Forouhi NG, Sharp SJ, Luben R, Bingham SA, Khaw KT, et al. Early age at menarche associated with cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 Dec;94(12):4953-60.
- (106) Canoy D, Beral V, Balkwill A, Wright FL, Kroll ME, Reeves GK, et al. Age at menarche and risks of coronary heart and other vascular diseases in a large UK cohort. *Circulation* 2015 Jan 20;131(3):237-44.
- (107) Lazar L, Lebenthal Y, Yackobovitch-Gavan M, Shalitin S, de Vries L, Phillip M, et al. Treated and untreated women with idiopathic precocious puberty: BMI evolution, metabolic



outcome, and general health between third and fifth decades. *J Clin Endocrinol Metab* 2015 Apr;100(4):1445-51.

(108) Meczekalski B, Podfigurna-Stopa A, Smolarczyk R, Katulski K, Genazzani AR. Kallmann syndrome in women: from genes to diagnosis and treatment. *Gynecol Endocrinol* 2013 Apr;29(4):296-300.

(109) Maione L, Dwyer AA, Francou B, Guiochon-Mantel A, Binart N, Bouligand J, et al. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Genetic counseling for congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome: new challenges in the era of oligogenism and next-generation sequencing. *Eur J Endocrinol* 2018 Mar;178(3):R55-80.

(110) Mitchell AL, Dwyer A, Pitteloud N, Quinton R. Genetic basis and variable phenotypic expression of Kallmann syndrome: towards a unifying theory. *Trends Endocrinol Metab* 2011 Jul;22(7):249-58.

(111) Topaloglu AK. Update on the Genetics of Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2017 Dec 30;9(Suppl 2):113-22.

(112) Cassatella D, Howard SR, Acierno JS, Xu C, Papadakis GE, Santoni FA, et al. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of growth and puberty have distinct genetic architectures. *Eur J Endocrinol* 2018 Apr;178(4):377-88.

(113) Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler M, et al. Kallmann Syndrome: Mutations in the Genes Encoding Prokineticin-2 and Prokineticin Receptor-2. *PLoS Genet* 2006;2(10):e175.

(114) Dodé C, Hardelin JP. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009 Feb;17(2):139-46.

(115) Bless E, Raitcheva D, Henion TR, Tobet S, Schwarting GA. Lactosamine modulates the rate of migration of GnRH neurons during mouse development. *Eur J Neurosci* 2006;24(3):654-60.

(116) Dodé C, Rondard P. PROK2/PROKR2 Signaling and Kallmann Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4:19.

(117) Jongmans MCJ, van Ravenswaaij-Arts, C. M. A., Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten, H. L., et al. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin Genet* 2009;75(1):65-71.

(118) Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B, et al. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet* 2013 May 2;92(5):725-43.

(119) Sarfati J, Guiochon-Mantel A, Rondard P, Arnulfi, Garcia-Piñero A, Wolczynski S, et al. A Comparative Phenotypic Study of Kallmann Syndrome Patients Carrying Monoallelic and Biallelic Mutations in the Prokineticin 2 or Prokineticin Receptor 2 Genes. *jcem* 2010;95(2):659-669.

(120) Cariboni A, André V, Chauvet S, Cassatella D, Davidson K, Caramello A, et al. Dysfunctional SEMA3E signaling underlies gonadotropin-releasing hormone neuron deficiency in Kallmann syndrome. *J Clin Invest* 2015 Jun;125(6):2413-28.

(121) Lima Amato LG, Latronico AC, Gontijo Silveira LF. Molecular and Genetic Aspects of Congenital Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017 Jun;46(2):283-303.

- (122) Balasubramanian R, Crowley WF. Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Deficiency. En: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al, editors. GeneReviews® Internet Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2017.
- (123) Kallmann FJ, Schoenfeld WA, Barrera SE. The genetic aspects of primary eunuchoidism. *American journal of mental deficiency* 1944;48:203-36.
- (124) De Morsier G. Etudes sur les dysraphies cranio-encephaliques.I. Agenesie des lobes olfactifs (telencephaloschizis lateral) et des commissures calleuse et anterieure (telencephaloschizis median):la dysplasie olfacto-genitale. *Schweizer Archiv für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 1954;74:309-61.
- (125) Yoshida K, Rutishauser U, Crandall JE, Schwarting GA. Polysialic Acid Facilitates Migration of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neurons on Vomeronasal Axons. *J Neurosci* 1999;19(2):794-801.
- (126) Kim SH. Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism and Kallmann Syndrome: Past, Present, and Future. *Endocrinology and metabolism (Seoul, Korea)* 2015;30(4):456-466.
- (127) The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D506-15.
- (128) Hutchins BI, Kotan LD, Taylor-Burds C, Ozkan Y, Cheng PJ, Gurbuz F, et al. CCDC141 Mutation Identified in Anosmic Hypogonadotropic Hypogonadism (Kallmann Syndrome) Alters GnRH Neuronal Migration. *Endocrinology* 2016 -5;157(5):1956-66.
- (129) Xu C, Messina A, Somm E, Miraoui H, Kinnunen T, Acierno J,Jr, et al. KLB, encoding B-Klotho, is mutated in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *EMBO Mol Med* 2017;9(10):1379-97.
- (130) Howard SR, Guasti L, Ruiz-Babot G, Mancini A, David A, Storr H, et al. IGSF10 mutations dysregulate gonadotropin-releasing hormone neuronal migration resulting in delayed puberty. *EMBO Mol Med* 2016;8(6):626-42.
- (131) Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015 May;17(5):405-24.
- (132) Botkin JR, Belmont JW, Berg JS, Berkman BE, Bombard Y, Holm IA, et al. Points to Consider: Ethical, Legal, and Psychosocial Implications of Genetic Testing in Children and Adolescents. *Am J Hum Genet* 2015 Jul 2;97(1):6-21.
- (133) European Society of, Human Genetics. Genetic testing in asymptomatic minors: Recommendations of the European Society of Human Genetics. *European journal of human genetics* : EJHG 2009;17(6):720-1.
- (134) COMMITTEE ON BIOETHICS, COMMITTEE ON GENETICS A, AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS AND, GENOMICS SOCIAL, ETHICAL, LEGAL ISSUES COMMITTEE. Ethical and policy issues in genetic testing and screening of children. *Pediatrics* 2013 Mar;131(3):620-2.
- (135) Hernández M, Narvaiza JL, Rincón JM, Ruíz I, Sánchez E, Sobradillo B, et al. Curvas y tablas de crecimiento. Madrid-España: Garsi Editorial; 1988.

- (136) Roche. MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I Large Volume. 2016; Disponible en: <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/7178aa2b-3fbd-e611-b5a9-00215a9b3428>. Cita realizada el 23/02/2019.
- (137) QIAGEN. EZ1® DNA Blood Handbook&nbsp; 2015; Disponible en: <https://www.qiagen.com/nl/resources/resourcedetail?id=a815af41-355a-4598-b58b-9c2d3409e666&lang=en>. Cita realizada el 23/02/2019.
- (138) Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun;12(6):996-1006.
- (139) Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002 Jun 15;30(12):e57.
- (140) Quan P, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2018;18(4):1271.
- (141) Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015 Jan;43(Database issue):D447-52.
- (142) Köhler S, Carmody L, Vasilevsky N, Jacobsen JOB, Danis D, Gourdine JP, et al. Expansion of the Human Phenotype Ontology (HPO) knowledge base and resources. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D1018-27.
- (143) R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017. URL: <http://www.R-project.org/>.
- (144) Fox J, Bouchet-Valat M. Rcmdr: R Commander. R package. 2018;2.4-4.
- (145) Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016;536(7616):285-91.
- (146) Pérez AJ, Castañeda LY, Gonzalez A, Siu YJ. Estudio con RM de la anosmia congénita: Lo que el radiólogo debe saber. XXXII Congreso de la Sociedad Española de Radiología Médica; Oviedo-España; mayo 2014. [Citado el 27 de abril de 2019].
- (147) Hanchate NK, Giacobini P, Lhuillier P, Parkash J, Espy C, Fouveaut C, et al. SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genet* 2012 Aug;8(8):e1002896.
- (148) Bessa DS, Macedo DB, Brito VN, Franca MM, Montenegro LR, Cunha-Silva M, et al. High Frequency of MKRN3 Mutations in Male Central Precocious Puberty Previously Classified as Idiopathic. *Neuroendocrinology* 2017;105(1):17-25.
- (149) Ortiz-Cabrera NV, Riveiro R, Lopez-Martinez M, Pérez-Segura P, Aragon I, Ayuso C, et al. Correlación entre variantes detectadas en genes relacionados con el proceso de pubertad y Pubertad Precoz Central Idiopática. En: I Congreso Interdisciplinar de Genética Humana. Abril 2017. Madrid-España. Comunicación tipo póster.
- (150) Kouris A, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Kopanos C, Albarca Aguilera M, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics.* 2018 Oct 30. doi: 10.1093/bioinformatics/bty897.

- (151) Silveira-Neto A, Leal LF, Emerman AB, Henderson KD, Piskounova E, Henderson BE, et al. Absence of functional LIN28B mutations in a large cohort of patients with idiopathic central precocious puberty. *Hormone Res Paediatr.* 2012;78(3):144-50.
- (152) Tommiska J, Sorensen K, Aksglaede L, Koivu R, Puhakka L, Juul A, et al. LIN28B, LIN28A, KISS1, and KISS1R in idiopathic central precocious puberty. *BMC Res Notes* 2011 Sep 22;4:363.
- (153) Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009 May;37(9):e67.

## **Anexos**

- 1) Informe del comité ético de investigación clínica de la Fundación Jiménez Díaz.
- 2) Consentimiento informado utilizado en el estudio
- 3) Variantes encontradas por técnica de NGS, en cada columna se muestra la profundidad y % de la variante de cada uno de los tres pipelines de análisis bioinformático utilizado en rojo se resalta cuando la variante, aunque detectada, no cumplía con las características de calidad mínimas, profundidad mínima de 20X, frecuencia alélica mínima de 30%. Prof: profundidad. Frec: frecuencia. Cigos: cigosidad. Het: heterocigoto. Homo: homocigoto.
- 4) Estudio de la disomía uniparental materna cromosoma 14, citobanda 14q32.2-Haplotipos de las 28 familias estudiadas.
- 5) Ortiz-Cabrera NV, Riveiro-Alvarez R, Lopez-Martinez MA, Perez-Segura P, Aragon-Gomez I, Trujillo-Tiebas MJ, et al. Clinical Exome Sequencing Reveals MKRN3 Pathogenic Variants in Familial and Nonfamilial Idiopathic Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr* 2017;87(2):88-94.
- 6) Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales.

## HOJA DE INFORMACIÓN PARA DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN DE PATOLOGÍA PUBERAL

ETIQUETA IDENTIFICATIVA PACIENTE

### SERVICIO: GENÉTICA y PEDIATRÍA

MEDICO RESPONSABLE:

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Prof. Leandro Soriano Guillén

PROPORCIONA ESTE CONSENTIMIENTO:

DIAGNÓSTICO: Patología Puberal

PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO PROPUESTO:

- ☐ Estudio Genético Molecular  
☐ Estudio Citogenético  
☐ Investigación

### ESTUDIO GENÉTICO DE PATOLOGÍA PUBERAL

#### OBJETIVOS Y FINALIDAD DEL ESTUDIO:

Las enfermedades de base genética son una de las principales causas de mortalidad, discapacidad y dependencia en los países desarrollados.

En el momento actual se dispone del conocimiento obtenido del proyecto genoma humano, y existe un gran desarrollo de las herramientas biotecnológicas.

Por ello, el estudio de las causas embriológicas, fisiopatológicas y genéticas de estos procesos desde distintos puntos de vista, permitirá una prevención, diagnóstico y tratamiento más eficaces, con el objetivo final de disminuir la prevalencia y la morbilidad de estos procesos.

Nos proponemos identificar la causa genética de **Patología Puberal** presente en su hijo/a. La participación en este estudio diagnóstico es voluntaria y no supone ningún riesgo para usted.

En este caso se trata de un estudio: ☐ Diagnóstico ☐ Predictivo ☐ Portador

La participación de su hijo/a en este estudio es voluntaria, no supone ningún riesgo para su hijo/a y puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre esta enfermedad.

El Servicio de Genética Médica de la Fundación Jiménez Díaz se dedica al diagnóstico, prevención e investigación de las bases moleculares y celulares de las enfermedades hereditarias desde hace más de 30 años. Por otra parte, el Dr. Leandro Soriano Guillén es un referente en el estudio de **patologías puberales** y pertenece al grupo de trabajo de Pubertad de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica

Su colaboración puede ayudar a mejorar el conocimiento sobre estas enfermedades. Hasta el momento hemos realizado estudios similares con otros genes implicados en las patologías hereditarias y los resultados han contribuido de forma global a conocer sus causas, mejorar la información a las familias afectadas y a posibilitar una prevención, diagnóstico y tratamiento más rápido y eficaz disminuyendo la frecuencia y gravedad de las mismas.

#### DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:

El procedimiento a seguir es el habitual para el diagnóstico y el consejo genético, solicitados por Vd., sus familiares (padres o tutores legales) o su médico, para la evaluación clínica de la enfermedad:

La obtención de una muestra biológica (de 5 a 15 ml de sangre venosa o el cepillado del interior de la mejilla/saliva para la obtención de células bucales).

**MUESTRAS BIOLÓGICAS:**

A partir de las muestras biológicas, se extraerá el material genético necesario para el estudio (ADN y/o ARN) y/o se cultivarán los linfocitos (células existentes en la sangre) para la obtención de cromosomas.

Nosotros protegeremos la confidencialidad de las muestras asignándoles un código específico. Su muestra sólo será identificada a través del código que la ligará a usted. La decodificación sólo podrá ser llevada a cabo por el facultativo responsable o la persona autorizada por él.

1.- Una pequeña parte de este material se utilizará para el análisis diagnóstico de los genes en estudio, relacionados con su patología.

Si Vd. acepta sólo los estudios genéticos descritos en este punto, su muestra se destruirá después de completar las pruebas.

2.- Es probable que en un futuro se descubran más genes que puedan estar también involucrados en el desarrollo de estas enfermedades. Por ello, se le solicita que autorice al Investigador a almacenar su muestra para el estudio de otros genes que se puedan descubrir en un futuro.

Si autoriza el almacenamiento, la muestra codificada se guardará de forma adecuada durante un periodo de hasta 20 años, en nuestro banco de ADN, en la Fundación Jiménez Díaz.

3.- Vd. debe decidir el destino que debemos dar a su muestra al término de esta investigación (puntos 1 y 2) y comunicárnoslo mediante el Consentimiento Informado.

Su muestra podría ser destruida, ser anonimizada (perderá los identificadores que la ligan a Vd. y por tanto no podrá ser localizada ni destruida) o ser almacenada hasta su posible incorporación a un nuevo estudio, para lo que necesariamente nuestro equipo tendría que ponerse en contacto con Vd., informarle y solicitarle un nuevo consentimiento.

**BENEFICIOS QUE SE ESPERAN ALCANZAR:**

La información que se produzca podría ser útil para su salud y la de su familia. Nosotros también esperamos que los resultados obtenidos nos permitan ampliar nuestros conocimientos en las enfermedades de base genética y posiblemente contribuir al beneficio de la sociedad en general.

Tiene Vd. ó su hijo/a (en caso de niños mayores de 12 años) derecho a conocer los resultados genéticos individuales y/o generales confirmados que se obtengan del análisis de las muestras donadas y las repercusiones clínicas conocidas que ello conlleva.

**RIESGOS Y ALTERNATIVAS:**

Aún cuando la toma de la muestra de sangre no cause problemas serios, ésta puede ocasionar un poco de sangrado, magulladura, desvanecimiento, vértigo, infección y/o molestia en el sitio de la inyección.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud/ la de su hijo/a, en ese caso se le entregaría un informe genético explicándole la implicación clínica que tiene la alteración genética identificada, en una consulta de "Consejo Genético".

Su muestra va a ser incluida en estudios de secuenciación masiva (exómica o genómica). Aunque este estudio permite descubrir numerosas mutaciones y variantes genéticas, el análisis bioinformático sólo estará enfocado a las posibles causas de la patología que Vd. padece. Aún así, el estudio podría resultar en algún hallazgo inesperado en alguna variante genética de interpretación dudosa o incierta. En esos casos le comunicamos que sólo le informaremos de los resultados de significado probado, que pudieran afectar de un modo grave a su salud y tuvieran utilidad clínica (posibilidad de mejorar su manejo clínico).

Vd. o su hijo/a (en caso de niños mayores de 12 años) debe advertir a los investigadores en caso de NO QUERER ser informado.

La información obtenida podría tener consecuencias para sus familiares. En ese caso, sería conveniente que Vd. mismo les transmitiera dicha información.

**FUENTE DE FINANCIACIÓN:**

**Cátedra de Patrocinio de Medicina Genómica Universidad Autónoma de Madrid.** Ni los investigadores ni los participantes en el estudio percibirán remuneración económica alguna por su participación.



**CONFIDENCIALIDAD Y DERECHOS DE ACCESO Y RECTIFICACIÓN:**

Toda la información (datos personales, clínicos, genéticos, etc.) será recogida y tratada de forma estrictamente confidencial por todo el personal y, respetará en todo momento lo establecido por la legislación aplicable y regulaciones vigentes en materia de, protección de datos de carácter personal y principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas. (Entre otras: Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente, Ley 14/1986 General de Sanidad y Ley 14/2007 de Investigación Biomédica). Únicamente el código permitirá a los investigadores responsables de la Fundación Jiménez Díaz hacer corresponder las muestras biológicas y los datos con las personas participantes.

Estos datos formarán parte de un fichero automatizado y/o manual cuya finalidad es la de gestionar su historia clínica y que estará ubicado en la Fundación Jiménez Díaz. El responsable del fichero es la Dirección Médica de la Fundación Jiménez Díaz con domicilio en la Avda. Reyes Católicos nº 2 Madrid (28.040), dónde podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición que en aplicación de la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos legalmente le asisten.

Ninguno de sus datos personales será transferido, únicamente algunos de los datos clínicos, codificados y sin ninguna identificación personal serán introducidos en bases de datos restringidas a la que sólo los investigadores pueden acceder.

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniendo una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes.

**CONSIDERACIONES ÉTICAS:**

Teniendo en cuenta que el estudio utiliza muestras para el estudio de genes, se respetarán los principios de la Declaración de Helsinki, los contenidos de la Declaración Universal de la UNESCO, y la ratificación del Convenio para la Protección de los Derechos Humanos y la Dignidad del Ser Humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina; BOE n. 251 de 20/10/1999).

Su participación en este estudio es completamente libre y voluntaria. Vds. ó su hijo/a (en caso de niños mayores de 12 años) pueden decidir no participar y, estará en libertad de retirarse del estudio en cualquier momento. Para ello deberá contactar con algún miembro del equipo investigador e indicar su decisión acerca del destino de sus muestras/datos personales.

Tómese el tiempo necesario para reflexionar sobre su decisión y discuta su participación en el proyecto con personas cercanas a Vd. antes de darnos su respuesta.

Le comunicamos que su decisión, sea cual sea, no afectará a su atención médica o la de sus familiares.

Si se dispone de nueva información que pueda ser relevante para su decisión de participar en el estudio, Vd. será informado.

Su participación en este estudio es completamente libre y voluntaria. Vd. puede decidir no participar y, estará en libertad de retirarse del estudio en cualquier momento. Para ello deberá contactar con algún miembro del equipo investigador e indicar su decisión acerca del destino de sus muestras/datos personales.

**Tal como exige la ley, para participar deberá firmar y fechar el documento de Consentimiento Informado.**

## CONSENTIMIENTO

Proporciona la información y este consentimiento:.....

Yo, D./D<sup>a</sup> ..... con DNI .....  
como (marcar lo que proceda):

- ☐ PACIENTE/PARTICIPANTE  
☐ REPRESENTANTE LEGAL:.....de.....  
☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de.....

Declaro bajo mi responsabilidad que:

- He/ha recibido una copia de la Hoja de Información al Participante y una copia firmada de este Consentimiento Informado.

- He/ha leído la Hoja de Información que se me/le ha entregado sobre el estudio.
- He/ha podido hacer preguntas sobre el estudio, he/ha recibido suficiente información sobre el estudio y la he/ha comprendido.
- Comprendo/e que la participación es voluntaria.
- He/ha tenido tiempo para reflexionar sobre mi/su decisión antes de dar el consentimiento.
- Comprendo/e que puedo/e retirarme/se del estudio:
  - 1) Cuando quiera.
  - 2) Sin tener que dar explicaciones.
  - 3) Sin que esto repercuta en mis/sus cuidados médicos.

Presto/a libremente mi/su conformidad para que (Marque con una X la parte del estudio a la que dé consentimiento):

**Punto 1.-** ☐ se pueda realizar el análisis diagnóstico en relación con el estudio genético de ..... en mi/su muestra de ADN.

- ☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a.

**Punto 2.-** ☐ se pueda realizar el análisis de secuenciación masiva en mi/su muestra, aceptando que sólo será informado de los resultados relacionados con su enfermedad.

**Punto 3.-** ☐ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 30 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con **Patología puberal**.

- En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud,

☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a.

**Punto 4.-** ☐ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

**Punto 5. –** al término de esta investigación, mis/sus muestras:

☐ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

☐ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.

☐ sean destruidas.

Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo del consentimiento oral	Firma del facultativo responsable
	<b>Nombre y Apellidos:</b> <b>Nº Colegiado:</b>
Fecha:	Fecha:

### REVOCACION DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, D./D<sup>a</sup> ..... como (marcar lo que proceda): ☐ PACIENTE/ ☐ REPRESENTANTE LEGAL O TUTOR/ ☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL DEL PACIENTE revoco/a libremente el consentimiento informado firmado en el presente documento para:

**Punto 1.-** ☐ se pueda realizar el análisis diagnóstico en relación con Patología Puberal en mi/su muestra de ADN.

☐ ser informado/a del resultado del diagnóstico genético.

**Punto 2.-** ☐ se pueda realizar el análisis de secuenciación masiva en mi/su muestra de ADN.

**Punto 3.-** ☐ se guarde mi/su muestra de ADN, durante al menos 30 años, permitiendo la realización de investigación en el futuro cuando se tengan más conocimientos sobre los genes relacionados con **Patología Puberal**.

☐ En caso de obtenerse de esta investigación resultados individuales y relevantes para mi salud,

☐ SI / ☐ NO deseo/a ser informado/a.

**Punto 4.-** ☐ mis/sus datos clínicos, sin identificación personal, sean introducidos en las bases de datos europeas de acceso restringido para los investigadores y colaboradores.

**Punto 5.** – al término de esta investigación, mis/sus muestras:

☐ sean almacenadas hasta que decida, por medio de un nuevo Consentimiento Informado, su inclusión en un nuevo proyecto.

Por ello deseo que mis muestras:

☐ sean anonimizadas, por lo tanto no podrán localizarse ni ser destruidas.

☐ sean destruidas.

Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo de la revocación oral	Firma del facultativo responsable  <b>Nombre y Apellidos:</b> <b>Nº Colegiado:</b>
Fecha:	Fecha:

### CAMBIO DE FACULTATIVO

Yo, D./D<sup>a</sup> ..... con DNI ..... como (marcar lo que proceda):

☐ PACIENTE/PARTICIPANTE

☐ REPRESENTANTE LEGAL: ..... de .....

☐ TESTIGO DEL CONSENTIMIENTO ORAL de .....

manifiesto/a conocer y autorizo/a que el facultativo designado para realizar el procedimiento que me ha sido propuesto sea el Dr: .....

<b>Manifiesto mi autorización al cambio de facultativo propuesto,</b> Firma del paciente/Representante legal o tutor/Testigo del consentimiento oral	Firma del facultativo que va a realizar el procedimiento  <b>Nombre y Apellidos:</b> <b>Nº Colegiado:</b>
Fecha	Fecha



### **ANEXO 3**

Variantes encontradas por técnica de NGS, en cada columna se muestra la profundidad y % de la variante de cada uno de los tres pipelines de análisis bioinformático utilizado en rojo se resalta cuando la variante, aunque detectada, no cumplía con las características de calidad mínimas, profundidad mínima de 20X, frecuencia alélica mínima de 30%. Prof: profundidad. Frec: frecuencia. Cigos: cigosidad. Het: heterocigoto. Homo: homocigoto

Paciente	Filtrado	Gen NM	HGVS	SNP DB	VariantStudio			SOPHIA			Pipeline FJD		
					Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos
15-0136	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>MKRN3</i> NM_005664.3 NP_005655	c.663C>T p.Pro221=	rs2239669	130	51	Het	156	46	Het	67	28	/
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_000510.2 NP_000501.1	c.59G>T p.Ser20Ile	rs6170	132	49	Het	177	46	Het	85	52	Het
			c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	122	99	Homo	158	98	Homo	34	97	Homo
		<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	45	57	Het	54	53	Het	36	28	Het
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	83	35	Het	104	37	Het	63	46	Het
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	76	31	Het	94	32	Het	50	44	Het
			c.183+11T>C	rs2387588	44	32	Het	58	36	Het	/	/	/
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	138	45	Het	173	45	Het	56	48	Het
		<i>GHRL</i> NM_001134941 NP_01128413	c.266A>T p.Gln89Leu	rs4684677	40	39	Het	50	36	Het	36	39	Het
			c.211C>A p.Leu71Met	rs696217	37	32	Het	43	40	Het	24	21	/
		<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	52	100	Homo	64	95	Homo	32	100	Homo
14-2004	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>GNRH1</i> NM_000825 NP_000816	c.59G>C p.Trp20Ser	rs6185	72	99	Homo	86	98	Homo	62	100	Homo
		<i>KISS1R</i> NM_032551 NP_115940	c.24A>G p.Gly8=	rs10407968	60	39	Het	77	36	Het	43	42	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	80	98	Homo	110	98	Homo	35	100	Homo
			c.82T>C p.Trp28Arg	rs1800447	81	42	Het	98	37	Het	38	18	/
		<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.104T>T p.Ile35Thr	rs34349826	79	34	Het	93	32	Het	30	20	/
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	80	34	Het	95	33	Het	28	14	/
			c.183+11T>C	rs2387588	54	35	Het	69	41	Het	24	17	/
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	147	48	Het	184	48	Het	83	57	/
		<i>ADIPOQ</i> NM_001177800 NP_001171271	c.45T>G p.Gly15=	rs2241766	51	51	Het	60	53	Het	21	76	Het
		<i>FSHR</i> NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	48	100	Homo	57	98	Homo	31	100	Homo
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	48	100	Homo	59	98	Homo	37	100	Homo
		<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	52	100	Homo	56	100	Homo	34	100	Homo
15-0214	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>MKRN3</i> NM_005664.3 NP_005655	c.663C>T p.Pro221=	rs2239669	156	43	Het	206	39	Het	86	59	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	106	46	Het	132	46	Het	44	34	Het

Paciente	Filtrado	Gen NM	HGVS	SNP DB	VariantStudio			SOPHIA			Pipeline FJD		
					Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos
15-0214	2 <sup>do</sup> filtrado	LHB NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	57	61	Het	70	60	Het	29	62	Het
			c.45G>A p.Met15Ile	rs34247911	116	52	Het	139	51	Het	38	32	Het
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	131	47	Het	159	50	Het	45	27	/
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	122	48	Het	149	49	Het	40	23	/
			c.183+11T>C	rs2387588	57	39	Het	69	44	Het	26	37	Het
			c.183+18del	rs140502544				51	47		25	32	Het
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	143	67	Het	165	66	Het	69	52	Het
		FSHR NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	77	99	Homo	91	96	Homo	38	100	Homo
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	56	96	Homo	66	97	Homo	34	100	Homo
		PROKR2 NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	54	39	Het	60	38	Het	30	63	Het
15-0368	1 <sup>er</sup> filtrado	KISS1 NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	74	47	Het	87	47	Het	54	46	Het
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	45	41	Het	56	41	Het	22	41	Het
		KISS1R NM_032551 NP_115940	c.24A>G p.Gly8=	rs10407968	59	56	Het	65	57	Het	33	55	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	FSHB NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	107	36	Het	136	37	Het	54	57	Het
		LHB NM_000894 NP_000885	c.82T>C p.Trp28Arg	rs1800447	82	35	Het	97	38	Het	40	35	Het
			c.104T>C p.Ile35Thr	rs34349826	82	33	Het	98	36	Het	28	32	Het
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	82	36	Het	96	40	Het	27	30	Het
			c.183+11T>C	rs2387588	52	31	Het	58	35	Het	25	35	Het
			c.183+18del	rs140502544	/	/	/	51	31	/	26	39	Het
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	104	48	Het	120	45	Het	109	52	Het
		FSHR NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	61	98	Homo	72	93	Het	22	100	Homo
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	39	44	Het	49	49	Het	34	65	Het
		ADIPOQ NM_001177800 NP_001171271	c.45T>G p.Gly15=	rs2241766	33	46	Het	39	46	Het	28	40	Het
		PROKR2 NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	44	100	Homo	49	98	Homo	25	100	Homo
15-0441	1 <sup>er</sup> filtrado	KISS1R NM_032551 NP_115940	c.924T>G p.Ala308=		20	100	Homo	/	/	/	6	67	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	LHB NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	52	49	Het	59	49	Het	24	63	Het
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	89	42	Het	112	41	Het	53	40	Het
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	81	39	Het	100	39	Het	45	29	/
			c.183+11T>C	rs2387588	45	33	Het	55	29	Het	28	21	/
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	166	50	Het	204	50	Het	97	51	Het

Paciente	Filtrado	Gen NM	HGVS	SNP DB	VariantStudio			SOPHIA			Pipeline FJD		
					Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos
15-0441	2 <sup>do</sup> filtrado	PROKR2 NM_144773 NP_658986	c.525G>C p.Ala175=	rs3746683	26	50	Het	29	45	Het	/	/	/
			c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	45	49	Het	55	47	Het	25	56	Het
15-0443	1 <sup>er</sup> filtrado	KISS1 NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	62	48	Het	82	55	Het	31	58	Het
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	56	38	Het	74	27	Het	15	40	/
		MKRN3 NM_005664.3 NP_005655	c.663C>T p.Pro221=	rs2239669	100	51	Het	149	49	Het	96	42	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	FSHB NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	88	59	Het	108	57	Het	52	42	Het
		LHB NM_000894 NP_000885	c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	145	61	Het	172	58	Het	55	60	Het
		FSHR NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	32	88	Homo	49	88	Homo	29	97	Homo
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	40	100	Homo	43	98	Homo	22	100	Homo
		PROKR2 NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	41	97	Homo	/	/	/	13	100	Homo
15-0569	1 <sup>er</sup> filtrado	KISS1 NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	45	50	Het	42	61	Het	19	58	/
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	36	41	Het	43	34	Het	12	58	/
		TACR3 NM_001059.2 NP_001050.1	c.1345G>A p.Ala449Thr	rs17033889	48	59	Het	49	53	Het	28	57	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	FSHB NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	62	45	Het	67	41	Het	38	50	Het
		LHB NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	26	35	Het	28	36	Het	20	67	
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	52	46	Het	59	49	Het	37	35	
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	46	48	Het	49	53	Het	38	37	
			c.183+11T>C	rs2387588	24	39	Het				28	25	
			c.183+18del	rs140502544							33	18	
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	61	43	Het	54	54	Het	63	51	
		FSHR NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	32	74	het	31	71	Het	28	61	
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	21	48	Het	23	57	Het	17	41	
		PROKR2 NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	17	100	Homo	20	100	Homo	22	100	Homo
15-0565	1 <sup>er</sup> filtrado	GNRHR NM_000406 NP_000397	c.453C>T p.Ser151=	rs4986942	25	38	Het	30	36	Het	25	60	Het
		KISS1 NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	39	62	Het	53	68	Het	54	43	Het
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	27	48	Het	49	43	Het	31	36	Het



Paciente	Filtrado	Gen NM	HGVS	SNP DB	VariantStudio			SOPHIA			Pipeline FJD		
					Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos
15-0565	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>MKRN3</i> NM_005664.3 NP_005655	c.663C>T p.Pro221=	rs2239669	87	49	Het	85	52	Het	61	57	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_00510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	41	51	Het	50	50	Het	51	53	Het
		<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.114C>G p.Val38=	rs6521	39	95	Homo	73	86	Homo	52	85	Homo
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	36	94	Homo	66	82	Homo	46	78	Het
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	84	100	Homo	91	91	Homo	66	95	Homo
		<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	29	52	Het	36	45	Het	39	38	Het
15-0572	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>GNRHR</i> NM_000406 NP_000397	c.453C>T p.Ser151=	rs4986942	47	49	Het	55	49	Het	17	53	
		<i>KISS1</i> NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	83	57	Het	89	58	Het	42	55	Het
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	62	45	Het	81	45	Het	44	70	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	53	43	Het	61	48	Het	32	44	Het
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	85	37	Het	92	37	Het	53	49	Het
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	83	39	Het	95	41	Het	47	47	Het
			c.183+11T>C	rs2387588	52	41	Het	52	40	Het	24	46	Het
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	149	58	Het	142	62	Het	91	47	Het
		<i>FSHR</i> NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	52	100	Homo	56	100	Homo	28	100	Homo
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	58	40	Het	63	41	Het	34	36	Het
		<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	68	49	Het	74	51	Het	13	70	
15-0677	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>KISS1</i> NM_002256.3 NP_002247	c.107A>G p.Gln36Arg	rs35431622	116	38	Het	109	37	Het	43	67	Het
			c.268C>G p.His90Asp	rs201073751	81	49	Het	88	47	Het	38	53	Het
		<i>TAC3</i> NM_013251.3 NP_037383	c.295T>C p.Ser99Pro	rs73334764	58	36	Het	21	48	Het	/	/	/
		<i>GNRHR</i> NM_000406 NP_000397	c.453C>T p.Ser151=	rs4986942	40	40	Het	47	45	Het	12	67	
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	111	55	Het	130	49	Het	39	28	
		<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	50	39	Het	57	42	Het	27	63	Het
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	109	45	Het	131	47	Het	33	40	Het
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	98	98	Homo	120	99	Homo	31	100	
			c.183+11T>C	rs2387588	52	100	Homo	67	100	Homo	17	100	
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	132	99	Homo	156	100	Homo	60	100	

Paciente	Filtrado	Gen NM	HGVS	SNP DB	VariantStudio			SOPHIA			Pipeline FJD		
					Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos
15-0677	2 <sup>do</sup> filtrado	FSHR NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	71	44	Het	73	41	Het	34	76	Het
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	55	100	Homo	59	100	Homo	25	100	Homo
		PROKR2 NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	62	61	Het	72	57	Het	21	48	Het
15-0702	1 <sup>er</sup> filtrado	KISS1 NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	94	48	Het	103	52	Het	41	54	Het
		KISS1R NM_032551.4 NP_115940	c.24A>G p.Gly8=	rs10407968	36	100	Homo	48	98	Homo	48	100	Homo
		MKRN3 NM_005664.3 NP_005655	c.663C>T p.Pro221=	rs2239669	167	45	Het	180	40	Het	125	39	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	LHB NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	58	100	Homo	74	100	Homo	22	100	Homo
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	85	99	Homo	89	100	Homo	66	100	Homo
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	81	99	Homo	91	100	Homo	65	100	Homo
			c.183+11T>C	rs2387588	40	100	Homo	43	100	Homo	30	100	Homo
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	144	100	Homo	166	99	Homo	88	100	Homo
		ADIPOQ NM_001177800 NP_001171271	c.331T>C p.Tyr111His	rs17366743	102	39	Het	115	38	Het	61	59	Het
		PROKR2 NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	53	100	Homo	57	100	Homo	26	100	Homo
15-0707	1 <sup>er</sup> filtrado	GNRH1 NM_000825 NP_000816	c.59G>C p.Trp20Ser	rs6185	62	44	Het	69	39	Het	38	45	Het
		KISS1 NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	58	34	Het	61	42	Het	32	31	Het
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	30	37	Het	39	38	Het	27	48	Het
		KISS1R NM_032551.4 NP_115940	c.1091T>A p.Leu364His	rs350132	20	45	Het	23	52	Het	15	53	Het
		MKRN3 NM_005664.3 NP_005655	c.663C>T p.Pro221=	rs2239669	134	44	Het	148	45	Het	57	49	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	LHB NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	21	100	Homo	26	100	Homo	25	100	Homo
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	57	97	Homo	69	99	Homo	17	100	Homo
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	53	94	Homo	64	95	Homo	14	100	Homo
			c.183+11T>C	rs2387588	25	100	Homo	31	100	Homo	13	100	Homo
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	88	100	Homo	118	99	Homo	64	100	Homo
		FSHR NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	45	100	Homo	43	100	Homo	17	100	Homo
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	26	100	Homo	27	93	Homo	23	100	Homo
		PROKR2 NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	29	100	Homo	34	100	Homo	15	100	

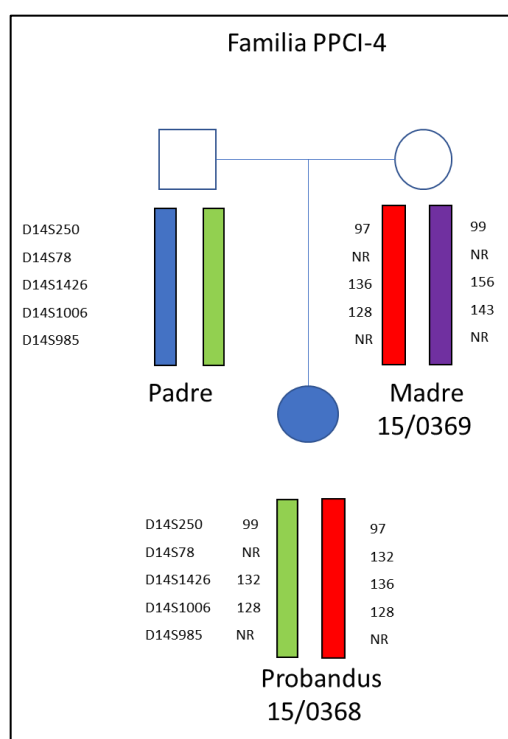
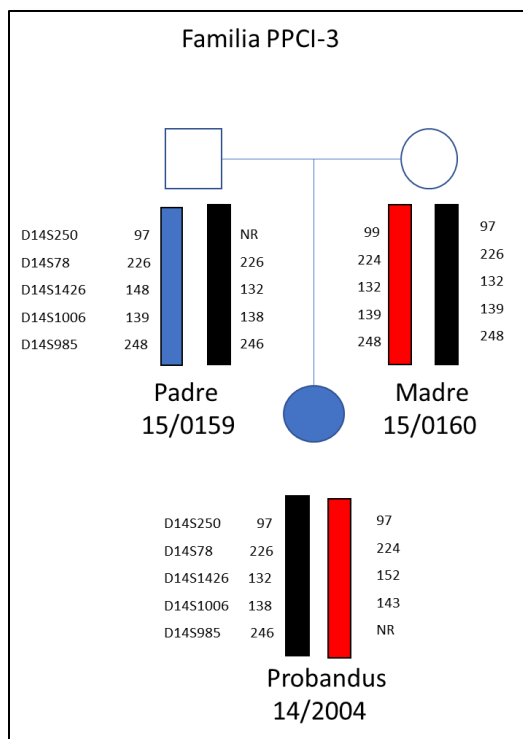
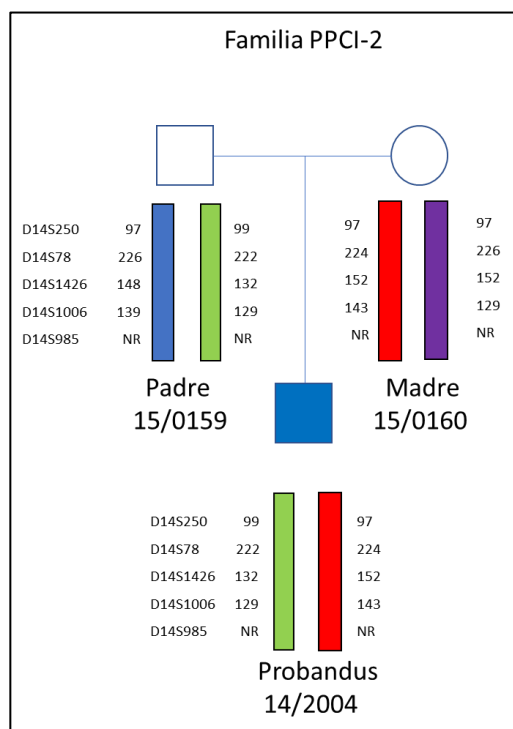
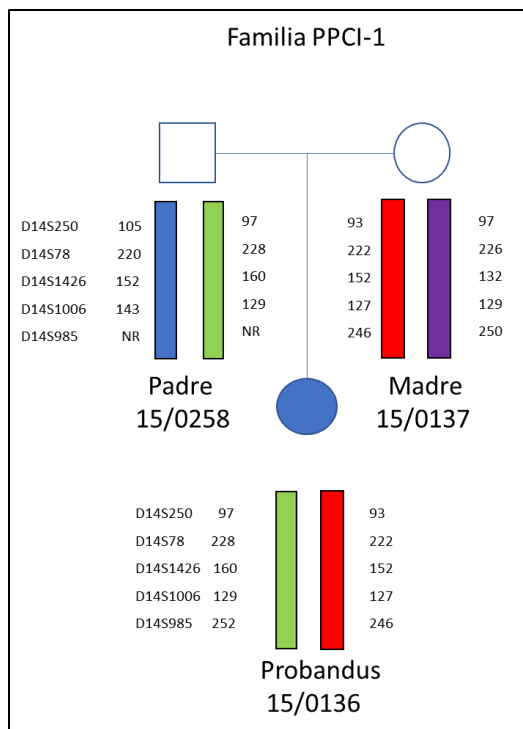
Paciente	Filtrado	Gen NM	HGVS	SNP DB	VariantStudio			SOPHIA			Pipeline FJD		
					Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos
15-0727	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>GNRH1</i> NM_000825 NP_000816	c.59G>C p.Trp20Ser	rs6185	49	55	Het	57	49	Het	26	46	Het
		<i>KISS1</i> NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	72	43	Het	69	57	Het	24	50	Het
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	48	45	Het	62	45	Het	19	53	
		<i>KISS1R</i> NM_032551.4 NP_115940	c.24A>G p.Gly8=	rs10407968	53	62	Het	53	66	Het	27	41	Het
		<i>MKRN3</i> NM_005664.3 NP_005655	c.663C>T p.Pro221=	rs2239669	107	45	Het	108	45	Het	50	56	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	92	49	Het	112	51	Het	35	43	Het
		<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	43	45	Het	47	60	Het	24	29	Het
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	80	45	Het	56	32	Het	28	64	Het
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	73	45	Het	51	33	Het	19	53	Het
			c.183+11T>C	rs2387588	41	40	Het	30	30	Het	17	47	Het
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	83	65	Het	87	69	Het	28	39	Het
		<i>FSHR</i> NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	42	50	Het	45	58	Het	20	40	Het
			c.1878T>C p.Tyr626=	rs114297239	74	49	Het	75	47	Het	33	58	Het
		<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	31	100	Homo	38	100	Homo	/	/	/
		<i>PDYN</i> NM_024411.4 NP_077722	c.600T>C p.His200=	rs6045819	37	56	Het	30	57	Het	/	/	/
15-0728	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>GNRH1</i> NM_000825 NP_000816	c.59G>C p.Trp20Ser	rs6185	82	94	Homo	97	97	Homo	23	100	Homo
		<i>KISS1</i> NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	61	49	Het	69	49	Het	26	46	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	94	63	Het	95	63	Het	32	61	Het
		<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	33	49	Het	32	53	Het	16	50	
			c.82T>C p.Trp28Arg	rs1800447	51	40	Het	70	43	Het	22	32	
			c.104T>C p.Ile35Thr	rs34349826	44	46	Het	74	39	Het	21	33	
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	43	100	Homo	70	100	Homo	19	100	
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	41	56	Homo	74	64	Het	17	71	
			c.183+11T>C	rs2387588	33	100	Homo	47	100	Homo	/	/	/
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	123	98	Homo	151	99	Homo	46	100	
		<i>FSHR</i> NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	41	98	Homo	49	98	Homo	22	100	Homo
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	34	100	Homo	33	100	Homo	24	100	Homo

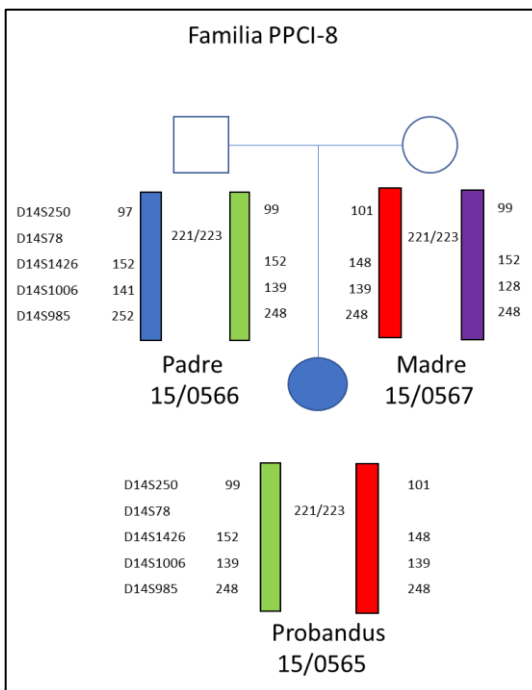
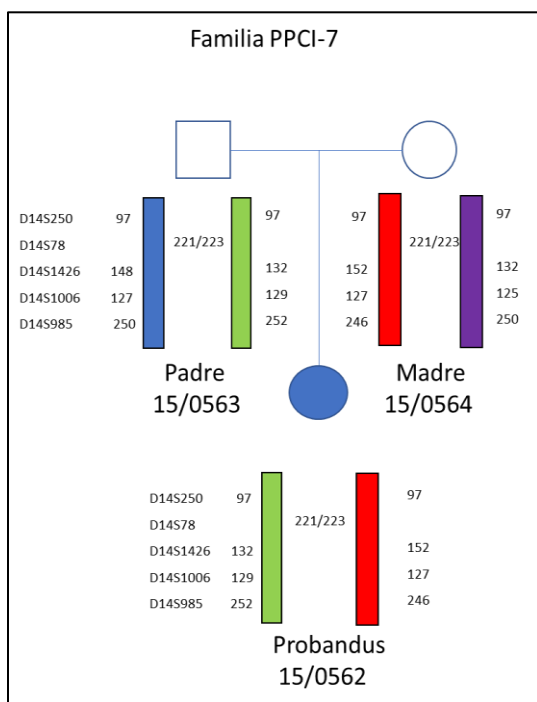
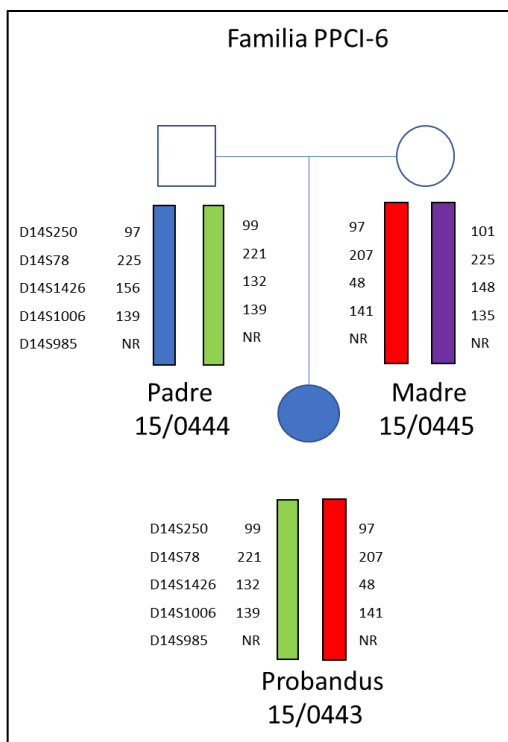
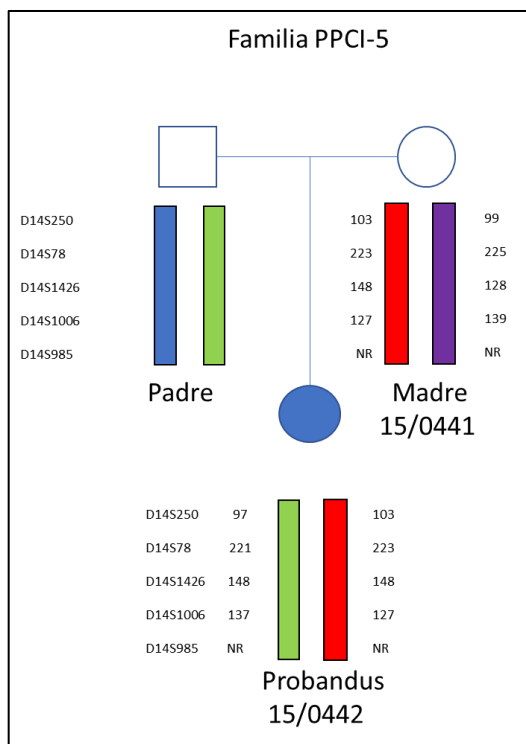
Paciente	Filtrado	Gen NM	HGVS	SNP DB	VariantStudio			SOPHIA			Pipeline FJD		
					Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos
15-0728	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	41	100	Homo	48	100	Homo	16	100	Homo
		<i>PDYN</i> NM_024411.4 NP_077722	c.600T>C p.His200=	rs6045819	34	46	Het	31	29	Het	/	/	/
15-0786	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>GNRH1</i> NM_000825 NP_000816	c.59G>C p.Trp20Ser	rs6185	60	42	Het	66	45	Het	20	45	Het
		<i>KISS1</i> NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	63	56	Het	63	55	Het	19	37	Het
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	42	49	Het	42	49	Het	/	/	/
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	79	57	Het	83	53	Het	10	26	
		<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	78	63	Het	85	66	Het	42	69	Het
		<i>FSHR</i> NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	45	65	Het	39	64	Het	13	54	
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	26	32	Het	24	33	Het	16	81	
		<i>GHRL</i> NM_001134941 NP_01128413	c.266A>T p.Gln89Leu	rs4684677	23	61	Het	26	61	Het	/	/	/
		<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	36	94	Homo	29	100	Homo	23	100	Homo
		<i>PDYN</i> NM_024411.4 NP_077722	c.600T>C p.His200=	rs6045819	35	35	Het	33	30	Het	15	47	
15-0791	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>GNRH1</i> NM_000825 NP_000816	c.59G>C p.Trp20Ser	rs6185	68	50	Het	80	60	Het			
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	43	63	Het	47	60	Het			
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	49	31	Het	56	32	Het	30	50	Het
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	47	32	Het	51	33	Het	12	25	
			c.183+11T>C	rs2387588	29	34	Het	30	30				
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	79	65	Het	87	69	Het	22	81	Homo
		<i>FSHR</i> NM_000145 NP_000136	c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	23	48	Het	26	50	Het	12	50	
		<i>GHRL</i> NM_001134941 NP_01128413	c.266A>T p.Gln89Leu	rs4684677	31	58	Het	36	58	Het	15	40	
15-0937	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>GNRH1</i> NM_000825 NP_000816	c.59G>C p.Trp20Ser	rs6185	54	44	Het	66	43	Het	21	48	Het
		<i>KISS1</i> NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	70	49	Het	63	55	Het	25	68	Het
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	51	61	Het	42	48	Het	31	61	Het

Paciente	Filtrado	Gen NM	HGVS	SNP DB	VariantStudio			SOPHIA			Pipeline FJD		
					Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos
15-0937	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>KISS1R</i> NM_032551.4 NP_115940	c.24A>G p.Gly8=	rs10407968	30	46	Het	36	41	Het	10	60	
		<i>MKRN3</i> NM_005664.3 NP_005655	c.203G>A p.Arg68His	rs149274884	117	53	Het	147	52	Het	14	43	
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	69	45	Het	85	48	Het			
		<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	28	100	Homo	33	100	Homo	13	100	
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	53	100	Homo	73	99	Homo	26	100	Homo
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	48	100	Homo	69	99	Homo	19	100	
			c.183+11T>C	rs2387588	24	100	Homo	43	95	Homo			
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	95	100	Homo	110	100	Homo	23	100	Homo
		<i>FSHR</i> NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	39	100	Homo	48	98	Homo			
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	27	96	Homo	31	94	Homo	15	100	
		<i>GHRL</i> NM_001134941 NP_01128413	c.266A>T p.Gln89Leu	rs4684677	25	48	Het	36	44	Het	11	36	
		<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	43	100	Homo	55	96	Homo	16	100	
15-0939	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>GNRHR</i> NM_000406.2 NP_000397.1	c.453C>T p.Ser151=	rs4986942	26	39	Het	30	40	Het			
		<i>MKRN3</i> NM_005664.3 NP_005655	c.663C>T p.Pro221=	rs2239669	61	43	Het	67	40	Het	44	45	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	31	55	Het	37	51	Het	12	50	
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	67	51	Het	71	50	Het			
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	61	50	Het	65	45	Het			
			c.183+11T>C	rs2387588	23	35	Het	26	39	Het	14	21	
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	62	48	Het	65	57	Het	46	57	Het
		<i>FSHR</i> NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	41	100	Homo	45	100	Homo	17	100	
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	22	100	Homo	21	100	Homo			
		<i>GHRL</i> NM_001134941 NP_01128413	c.266A>T p.Gln89Leu	rs4684677	44	48	Het	44	43	Het	22	50	Het
		<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	37	49	Het	44	52	Het			
15-1069	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>GNRH1</i> NM_000825 NP_000816	c.59G>C p.Trp20Ser	rs6185	73	100	Homo	81	100	Homo	21	100	Homo
		<i>KISS1</i> NM_002256.3 NP_002247	c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	49	45	Het	46	39	Het	21	62	
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	43	49	Het	49	45	Het	22	27	

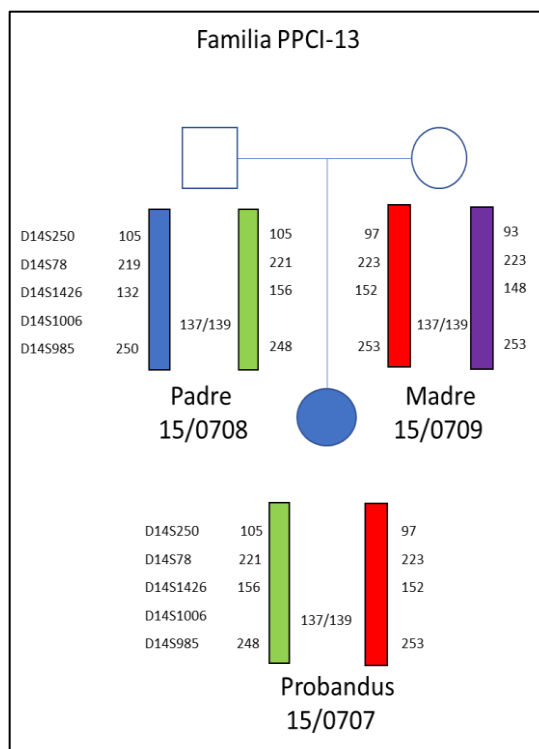
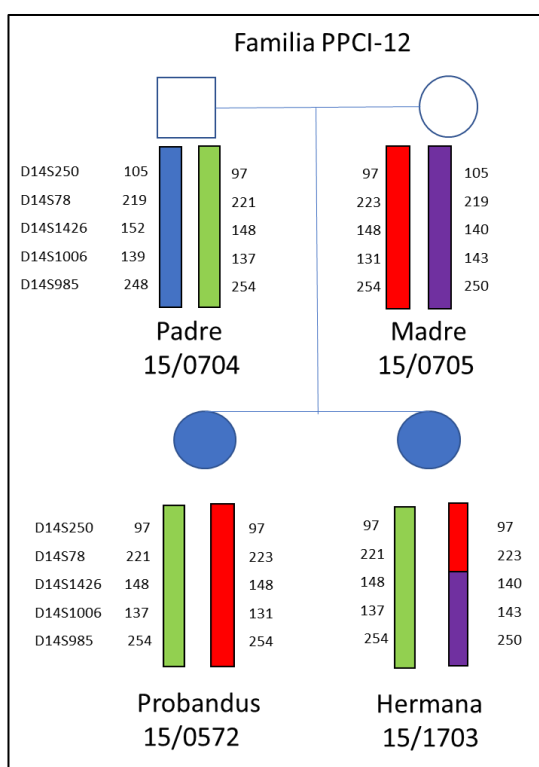
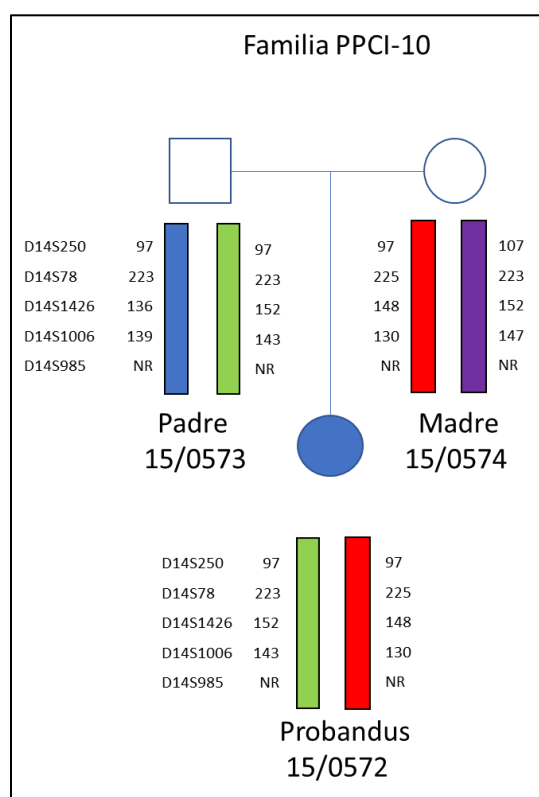
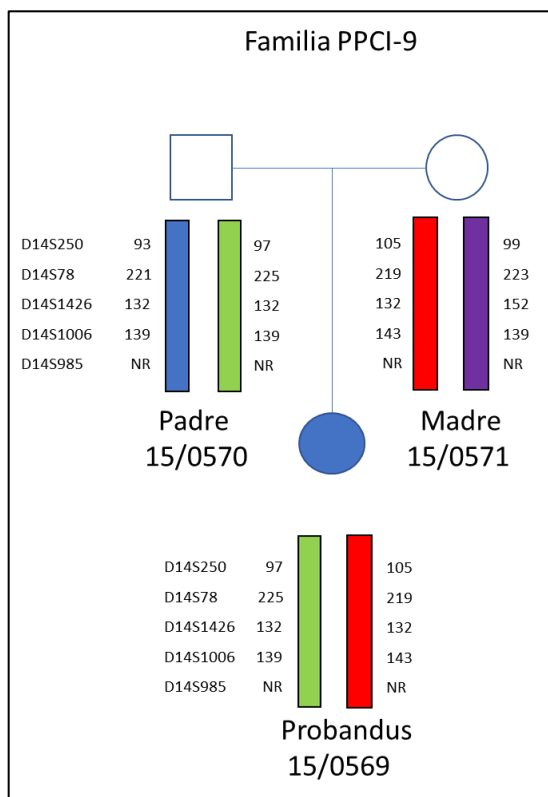
Paciente	Filtrado	Gen NM	HGVS	SNP DB	VariantStudio			SOPHIA			Pipeline FJD		
					Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos	Prof	Frec variante	Cigos
15-1069	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	60	45	Het	70	44	Het	21	43	Het
		<i>LHB</i> NM_000894 NP_000885	c.15+9A>G	rs2387589	24	21		25	24				
			c.114C>G p.Val38=	rs6521	43	49	Het	57	53	Het	19	37	Het
			c.132A>C p.Pro44=	rs1056914	41	54	Het	54	60	Het	16	38	Het
			c.183+11T>C	rs2387588	19	37		22	55	Het			
			c.285T>C p.Gly95=	rs1056917	68	58	Het	69	62	Het	36	50	Het
		<i>FSHR</i> NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	28	46	Het	27	44	Het	16	50	Het
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	26	69	Het	28	68	Het	15	47	Het
		<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	39	46	Het	45	47	Het			
15-1391	1 <sup>er</sup> filtrado	<i>KISS1</i> NM_002256.3 NP_002247	c.58G>A p.Glu20Lys	rs12998	17	64	Het	21	57	Het	13	69	
			c.242C>G p.Pro81Arg	rs4889	42	68	Het	45	69	Het	20	60	Het
			c.417delA p.Ter139Trp	rs71745629	24	54	Het	25	52	Het	12	50	
		<i>KISS1R</i> NM_032551.4 NP_115940	c.24A>G p.Gly8=	rs10407968	40	42	Het	31	58	Het			
		<i>MKRN3</i> NM_005664.3 NP_005655	c.663C>T p.Pro221=	rs2239669	52	64	Het	53	59	Het	33	55	Het
	2 <sup>do</sup> filtrado	<i>FSHB</i> NM_000510.2 NP_000501.1	c.228C>T p.Tyr76=	rs6169	35	32	Het	39	36	Het	25	60	Het
		<i>FSHR</i> NM_000145 NP_000136	c.919G>A p.Ala307Thr	rs6165	19	53	Het	45	100	Homo			
			c.2039G>A p.Ser680Asn	rs6166	19	58	Het	21	100	Homo	12	50	
		<i>PROKR2</i> NM_144773 NP_658986	c.585G>C p.Thr195=	rs3746682	23	100	Homo	24	100	Homo			

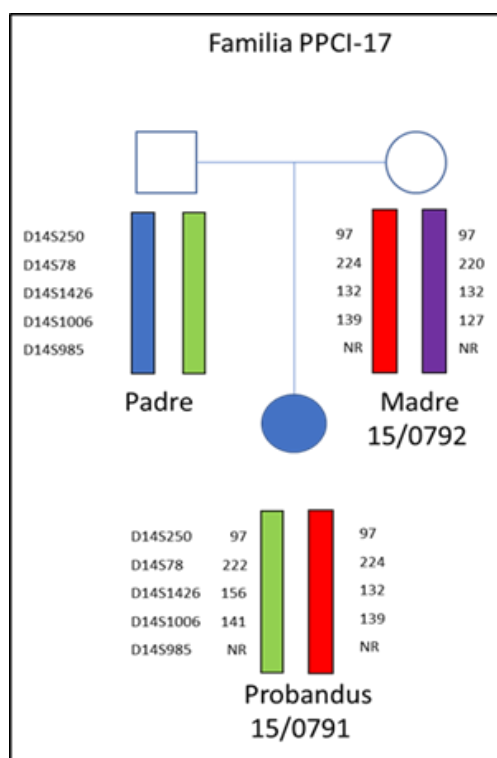
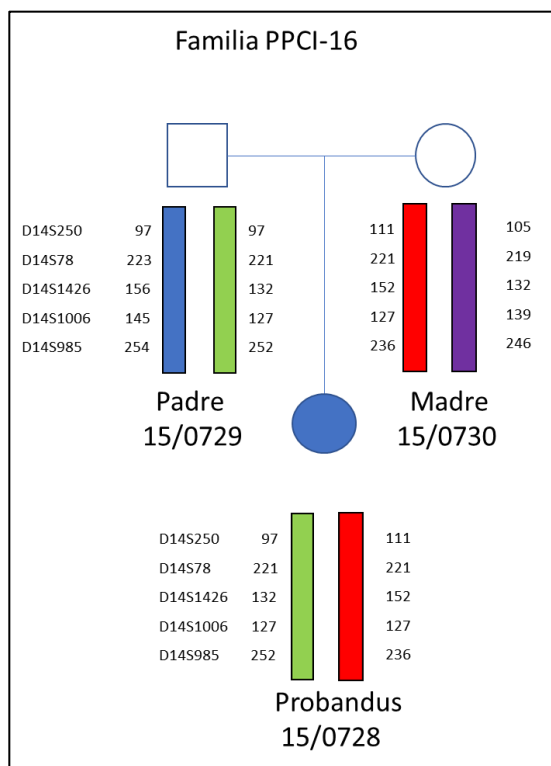
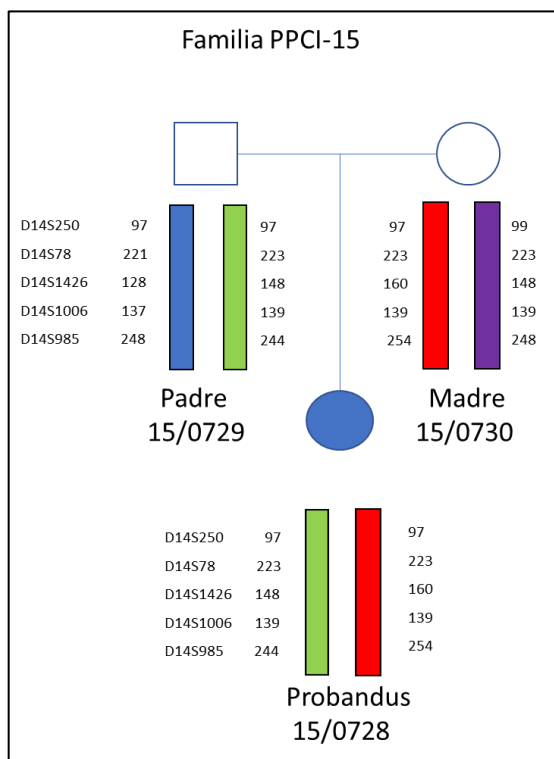
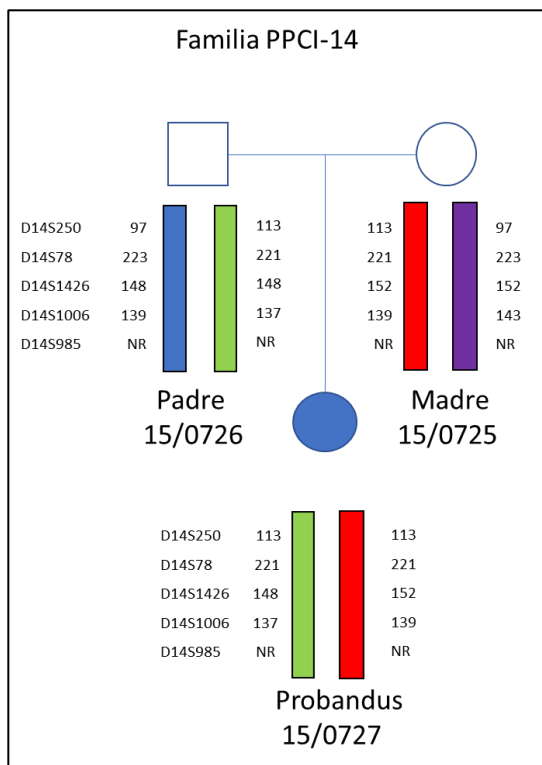
Anexo 4 Haplotipos de las 28 familias estudiadas. Se pudo descartar DUP en 26 de las 28 familias.

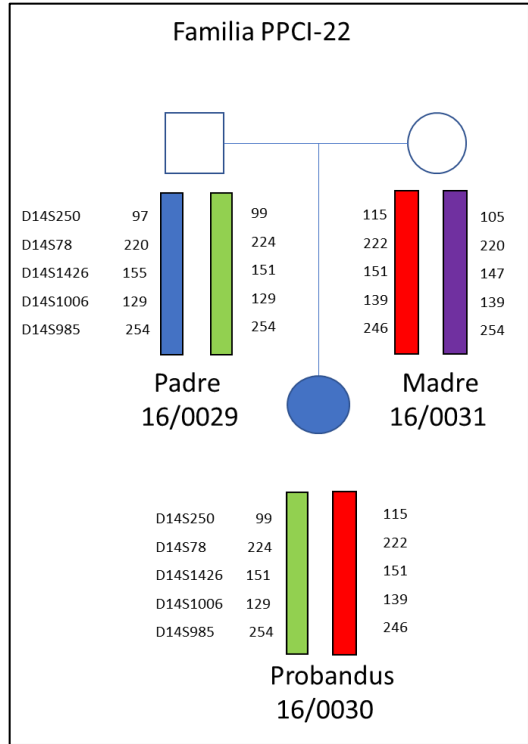
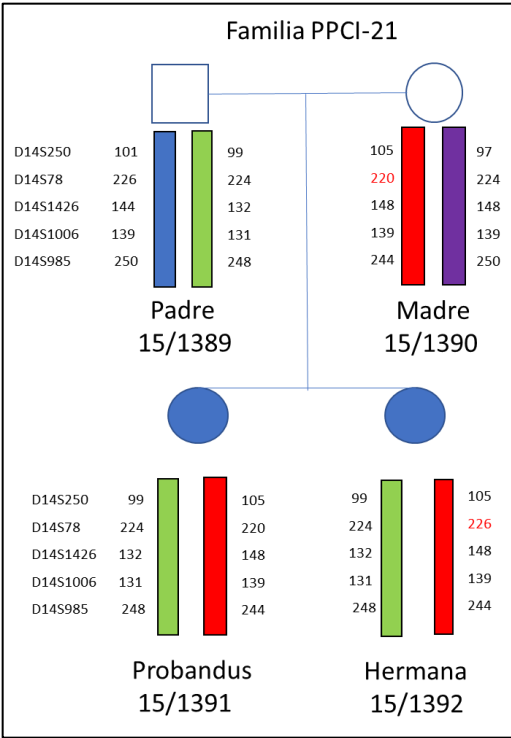
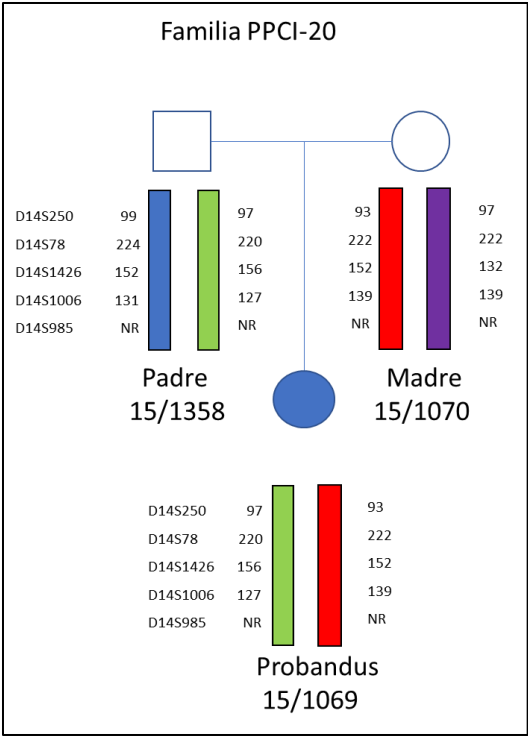
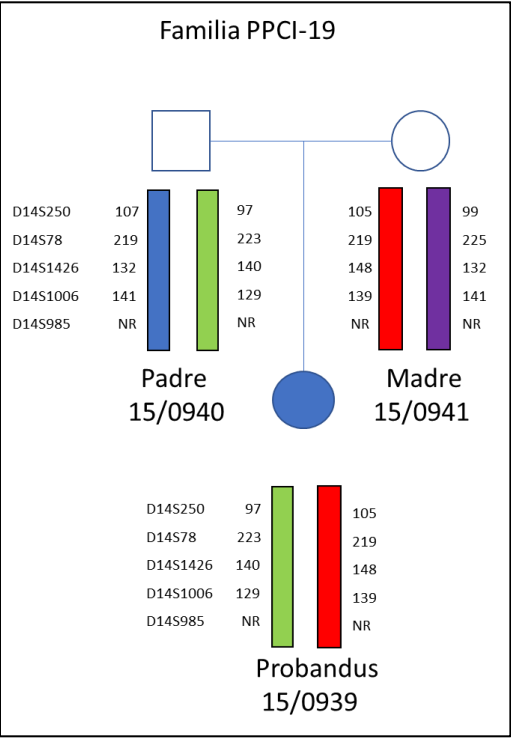


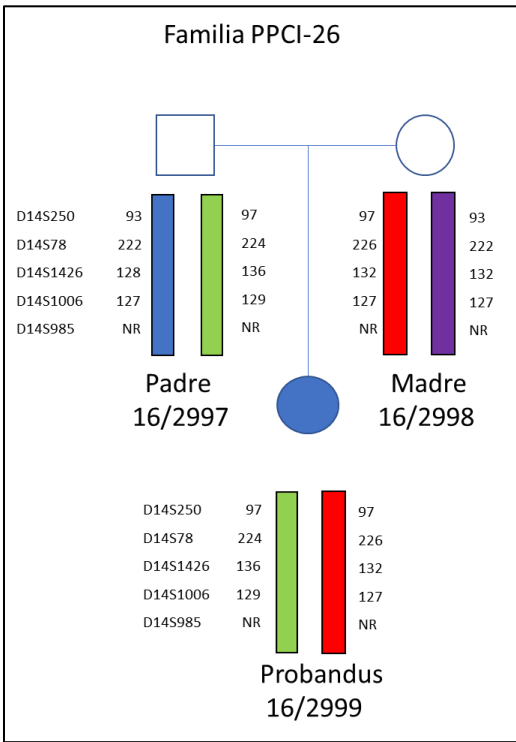
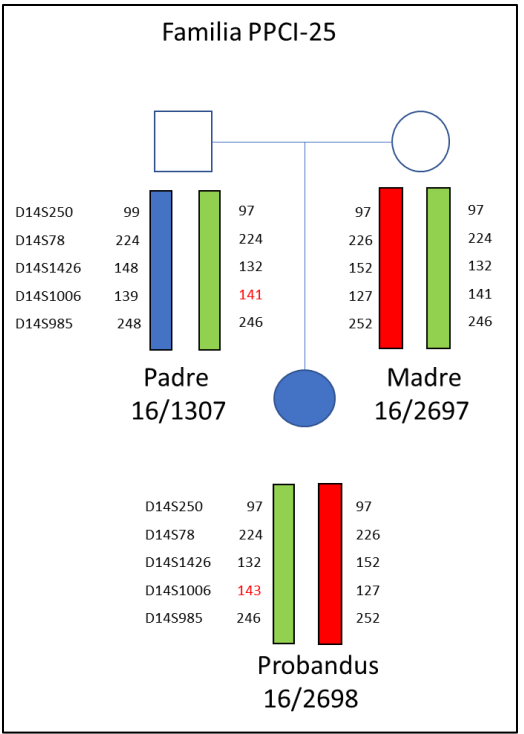
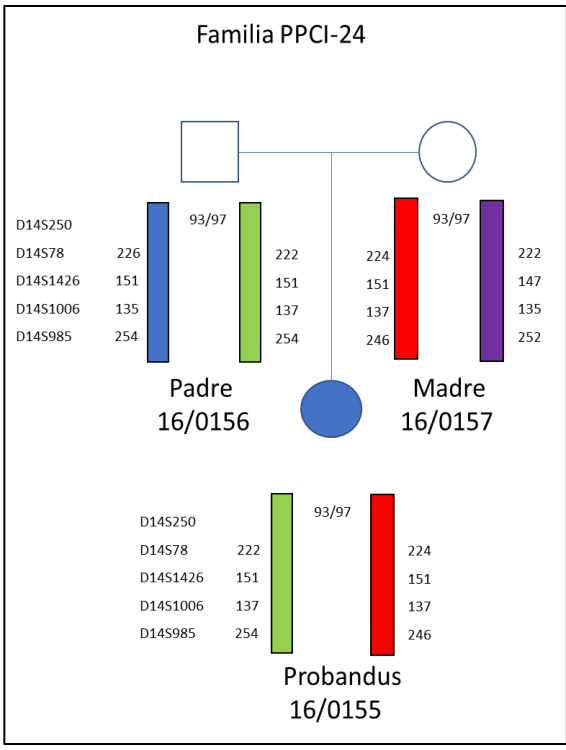
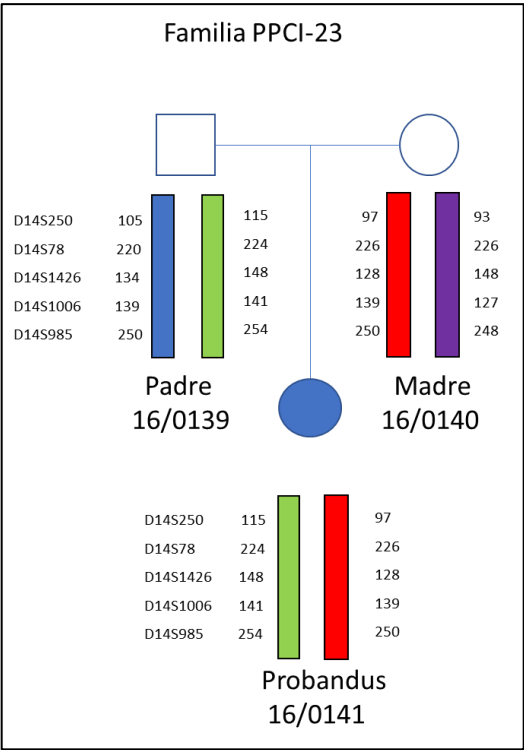


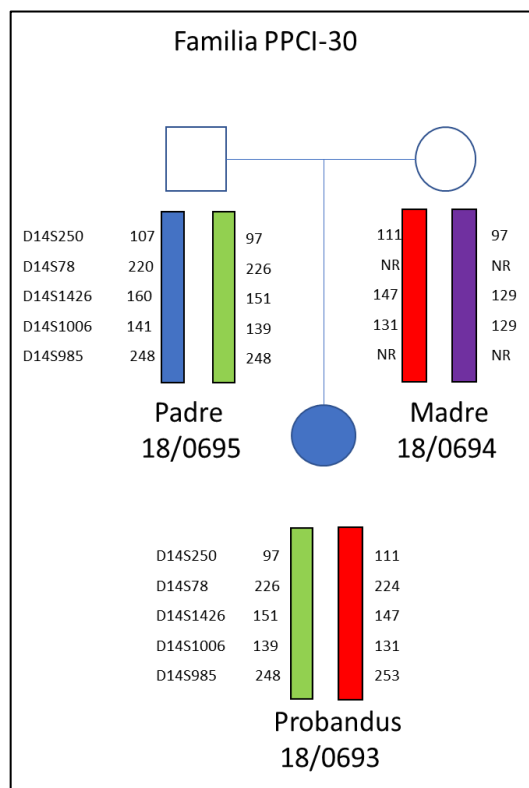
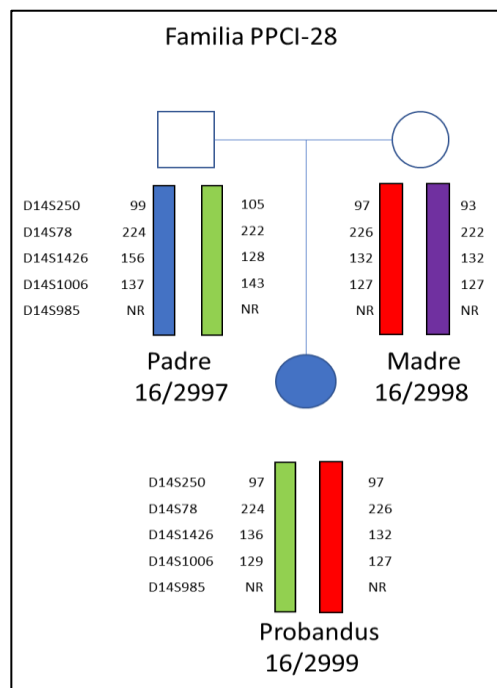
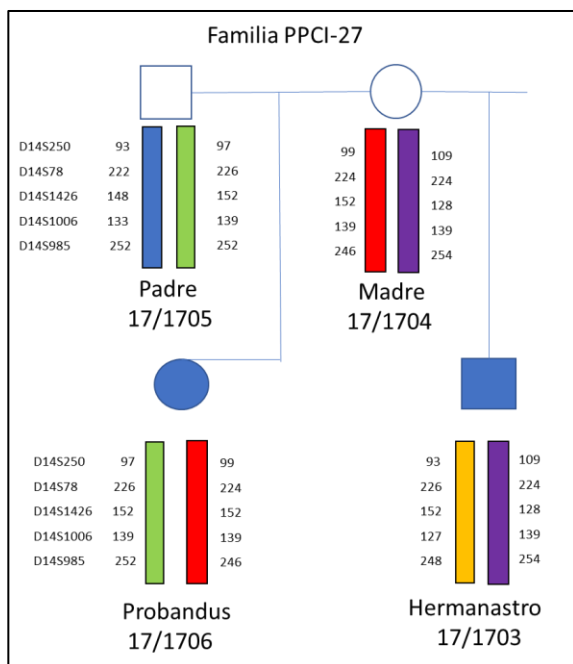












# Clinical Exome Sequencing Reveals *MKRN3* Pathogenic Variants in Familial and Nonfamilial Idiopathic Central Precocious Puberty

Nelmar Valentina Ortiz-Cabrera<sup>a, c</sup> Rosa Riveiro-Álvarez<sup>a</sup>  
Miguel Ángel López-Martínez<sup>a</sup> Pilar Pérez-Segura<sup>b</sup> Isabel Aragón-Gómez<sup>b</sup>  
María José Trujillo-Tiebas<sup>c</sup> Leandro Soriano-Guillén<sup>b</sup>

Departments of <sup>a</sup>Genetics and <sup>b</sup>Pediatrics, Health Research Institute-Jiménez Díaz Foundation University Hospital (IIS-FJD), Universidad Autónoma de Madrid, and <sup>c</sup>Department of Clinical Analysis, Hospital Universitario Clínico San Carlos, Madrid, Spain

## Keywords

Idiopathic central precocious puberty · *MKRN3* · Mutation

## Abstract

**Background/Aims:** Idiopathic central precocious puberty (ICPP) is the premature activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the absence of organic disease. Up to now, just gain-of-function mutations of *KISS1/KISS1R* and loss-of-function mutations of the maternally imprinted gene *MKRN3* are the known genetic causes of ICPP. Our intention is to evaluate variants present in genes related to the pubertal onset pathway that could act as disease-causing or predisposing variants. **Methods:** We studied the clinical exome of 20 patients diagnosed with ICPP using the Illumina platform. The bioinformatics analysis was performed using 2 different programs, and the variants were filtered according to a list of genes related to the gonadotropin-releasing hormone pathway. **Results:** In a “sporadic case,” we found a missense variant in *MKRN3* NM\_005664.3: c.203G>A, causing the protein change NP\_005655.1:p.Arg68His, predicted as pathogenic by 2 informatics tools. The proband carrying this variant was diagnosed with ICPP at 7.75 years of age. We did not find any pathogenic variants in *KISS1*, *KISS1R*, *LIN28*,

*GNRH*, *GNRHR*, *TACR3*, and *TAC3*. **Conclusion:** *MKRN3* is the most frequent genetic cause of familial ICPP, so it is wise to screen for *MKRN3* mutations in all patients with familial ICPP and in patients with an unclear paternal pubertal history.

© 2016 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Puberty is a complex process controlled at the hypothalamic level by an equilibrium between activator and inhibitor signals from neuromodulators, neurotransmitters, and cell-cell signaling molecules, produced by neuronal subsets or glial cells connected to gonadotropin-releasing hormone expressing (GnRH) neurons [1]. The crucial event is the change in the pattern of pulsatile secretion of GnRH from low-intensity and irregular peaks to high-amplitude and regular peaks. This shift can be explained, at least partially, by the change in predominant inhibitory transsynaptic inputs to GnRH neurons during childhood to a predominant excitatory mode during peripubertal age [2]. Puberty timing is species specific, but individuals of the same species can show developmental variations as a result of modifier genes and physiological conditions [3–7].

Kisspeptin- and glutamate-producing neurons in the hypothalamus are included in the excitatory branch of the system that controls the local production of GnRH. *TAC3* also has an excitatory effect on *KISS1*-producing neurons, and loss-of-function mutations in the genes that codify for *TAC3* and its receptor (*TACR3*) have been correlated with hypogonadotropic hypogonadism [8].

In the inhibitory branch, there are GABA and opioid neurons as well as probable E3 ubiquitin-protein ligase makorin-3 (*MKRN3*). The latter has been linked to the process of ubiquitination; specifically, it has been postulated that *MKRN3* could be an E3 ligase, that is the protein that makes the transfer of the ubiquitin molecule from the E2:ubiquitin complex to the substrate protein [9, 10]. The ubiquitination phenomenon may have different effects that range from facilitating the proteasome-dependent proteolysis to modulation of protein function and/or localization [10, 11].

Central precocious puberty (CPP) is defined as the premature activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis with the onset of breast development before 8 years of age in girls and an increase in testicular size in boys younger than 9 years of age that is progressive and accompanied by advancement of skeletal age and accelerated linear growth [12].

CPP is a rare disease with a female predominance (approximately 10:1) and with a notably higher risk among adopted girls [4, 13]. When CPP occurs in boys, it is more likely to be the result of a demonstrable central nervous system lesion [14]. In contrast, idiopathic CPP (ICPP) is the most common cause in girls [5]. Among those idiopathic cases, de Vries et al. [15] described 27.5% familial cases, suggesting an autosomal dominant pattern with incomplete penetrance. So far, variants in 3 genes have been related with the etiology of ICPP, i.e., *KISS1* [16], *KISS1R* [17], and *MKRN3* [2, 10, 18–24]. In *KISS1* and *KISS1R*, the pathologic variants are gaining function. In *MKRN3*, there are loss-of-function mutations, and it is also important to point out that this gene is maternally imprinted, which means that the pathogenic variant is inherited from the father. Mutations in *MKRN3* have been described in Brazilian [2, 10], American [2, 10], Korean [6], and European [10, 18–24] populations.

After the publication in 2008 of a case with a gain-of-function mutation in *KISS1*, there were expectations concerning the etiological value of this gene in ICPP, but so far, a European [25] and an Asian [26] group have found, in 28 and 272 ICPP patients, respectively, only relatively common single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in

*KISS1/KISS1R* that were not statistically different between girls with ICPP and controls.

The aim of this study was 3-fold: (1) to evaluate the presence of gene variants related to the pubertal onset pathway in order to find disease-causing or predisposing variants; (2) to assess the possible genotypic/phenotypic correlation; and (3) to find new candidate genes related to ICPP.

## Methods

### *Recruitment of Participants*

The study was reviewed and approved by the ethics committee of the University Hospital Fundación Jiménez Díaz and it was performed according to the tenets of the Declaration of Helsinki. The participants signed a written informed consent form after the nature of the procedures had been fully explained. The participants did not receive financial compensation. The collection of samples belongs to the Biobank of the University Hospital Fundación Jiménez Díaz.

### *Clinical Evaluation*

Patients diagnosed with ICPP had to meet all of the following criteria: girls diagnosed with progressive thelarche before 8 years of age, boys with testicular volume >4 ml (Prader orchidometer) before 9 years of age and confirmed luteinizing hormone (LH) peak >7 IU/L after LH-releasing hormone (LHRH) stimulation (100 µg/m<sup>2</sup>) test; bone age minus chronological age equals >1 year; and having a normal cranial magnetic resonance imaging performed [13].

The following clinical variables were gathered: ethnicity, age at the initial symptoms and diagnosis, weight (z-score for age and sex according to the reference population) [27], height (z-score for age and sex according to the reference population) [27], growth velocity (z-score for age and sex according to the reference population) [27], body mass index (z-score for age and sex according to the reference population) [27], Tanner stage [28, 29], bone age determined using the Greulich-Pyle method [30], difference between chronological and bone age, and basal and LH and follicle-stimulating hormone peak after LHRH stimulation test. Also, we collected the following ultrasound data: uterine length (millimeters). Finally, familial history of PP and maternal and paternal height and pubertal timing were obtained.

### *Genetic Analyses*

Genomic DNA samples were obtained from peripheral blood lymphocytes using an automatic DNA extractor (MagNA Pure Compact, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's recommendations. DNA concentration and sample quality were assessed using a fluorometric method (Qubit, Thermo Fisher Scientific).

Clinical exome sequencing, including library preparation, sequencing, and data analysis, was performed using validated protocols. Briefly, libraries were constructed and indexed using the TruSight One Sequencing Panel (Illumina). Finally, libraries were normalized and pooled prior to sequencing on a NextSeq 500 system (Illumina).

**Table 1.** Clinical characteristics and *MKRN3* genotype of patients included in this study

Family	Ethnicity	Age at presentation, years	Height, z-score	BMI, z-score	Tanner breast stage	Tanner pubic hair stage	Testicular volume R/L, mL	Growth velocity, z-score	BA – CA, years	Uterine length, mm	Family history of ICPP	Variant of <i>MKRN3</i>	Protein change
1	Latin American	6.75	1.96	1.84	2	1		1.85	1.85	35	none	NM_005664.3:c.663C>T(p.=)	
2	European	5	3.36	0.17		2	8/6	3.80	0.34		yes	WT	
3	European	2.33	2.36	–0.10	2	1		6.30	2.42	20	none	NM_005664.3:c.663C>T(p.=)	
4	Latin American	4.5	0.30	–1.09	2	1		3.64	0.92		none	WT	
5	European	6.25	0.52	0.37	2	1		1.37	1.08	30	none	WT	
6	European	0.25	2.74	2.25	2	2		2.15	2.67	37	none	NM_005664.3:c.663C>T(p.=)	
8	European	6.25	3.53	–1.40	2	1		2.40	2.50	37	yes	NM_005664.3:c.663C>T(p.=)	
9	European	7.33	1.39	–0.60	2	1		3.90	0.30	28	none	WT	
10	Latin American	7.33	0.87	0.07	2	2		7.50	0.00	31	none	WT	
11	African	7.12	4.21	1.32	2	2		4.00	0.75	32	none	WT	
12	European	6.83	2.91	1.15	3	2		2.95	2.50	41	yes	NM_005664.3:c.663C>T(p.=)	
13	European	2.5	2.79	2.10	3	2		0.65	1.92	40	none	NM_005664.3:c.663C>T(p.=)	
14	European	7.25	–0.67	0.11	3	1		2.97	1.17	30	yes	NM_005664.3:c.663C>T(p.=)	
15	European	7.25	0.72	0.39	2	1		2.25	0.50	42	yes	WT	
16	European	5.5	2.65	0.03	3	1		0.69	1.75	38	none	WT	
17	European	7.58	2.11	0.96	2	1		6.40	3.17	41	none	WT	
18	Latin American	7.75	1.06	1.17	2	2		4.15	3.17	34	none	NM_005664.3:c.203G>A	NP_005655.1:p.Arg68His
19	European	6.66	1.29	0.89	2	1		2.80	1.00	28	yes	NM_005664.3:c.663C>T(p.=)	
20	European	7	1.89	0.63	2	1		3.66	1.25	26	none	WT	
21	Gypsy	7.5	2.97	1.29	3	2		3.60	2.59	44	none	NM_005664.3:c.663C>T(p.=)	

BA, bone age; BMI, body mass index; CA, chronological age; ICPP, idiopathic central precocious puberty; L, left; R, right; WT, wild type.

Bioinformatic analyses were performed using the cloud-based genomics computing environment BaseSpace Sequence Hub (Illumina). The analysis of variants was performed using the VariantStudio v2.2 software (Illumina). We filtered the analysis of variants by 8 genes: *KISS1*, *KISSR1*, *TAC3*, *TACR3*, *MKRN3*, *GNRHR*, *GNRH*, and *LIN28B*.

All suspected pathogenic variants were confirmed by conventional Sanger sequencing (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genotypes of all other family members were determined by Sanger sequencing. Computational algorithms (PolyPhen and SIFT) were used to predict the pathogenicity of the missense variants.

#### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS software package, version 21.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). The Kolmogorov-Smirnov test was used to ascertain the normal distribution of all included variables. Data are reported as medians and interquartile ranges because data did not follow a normal distribution.

## Results

We included 20 patients diagnosed with ICPP in the study; 19 girls and 1 boy. Detailed clinical variables are presented in Table 1. In the whole group, the median age at initial symptoms was 6.79 years (range 0.25–7.75); the median age at diagnosis was 7.41 years (range 2.83–9.59).

The ethnicity was distributed as follows: Caucasian 70%, Latin American 20%, African 5%, and Gypsy 5%.

In 1 Latin American patient, we found a missense mutation in *MKRN3* NM\_005664.3: c.203G>A; this variant is responsible for the following protein change: NP\_005655.1:p.Arg68His. This change was predicted as possibly damaging by PolyPhen with a score of 0.749 and as deleterious by SIFT 40 with a score of 0.04. This variant has been reported in the NCBI dbSNP as rs149274884, having a frequency of 0.00001678 in the Exome Aggregation Consortium (ExAC). The presence of the mutation was confirmed by Sanger sequencing (primers available upon request), and using this technique we searched for the mutation in the proband's mother (the father's DNA was not available). The mother did not have the mutated allele.

The proband carrying the *MKRN3* mutation had pubertal changes (Tanner stage II) at 7.75 years of age with a height of +1.06 z-scores, an accelerated growth velocity (9 cm/year, +4.14 z-scores), and advanced bone age of 10.75 years (+3.17 z-scores). She also presented an LH peak after the LHRH stimulation test of 7.0 IU/L. The mother's height was –1.26 z-scores, and she had her menarche at 15 years of age. The father's height was 186 cm (+1.71 z-scores), and pubertal features were reported as normal. These data were obtained from the mother and



**Table 2.** Relation of *MKRN3* pathogenic variants published until 2016

Gene/variant cDNA	Protein change	Type	Fami- lies	Age of presenta- tion, female (average if >1 patient), years	Female, N	Age of presenta- tion, male (average if >1 patient), years <sup>a</sup>	Male, N	Population (number of families)	First author [ref.], year
<i>MKRN3</i> NM_005664.3									
c.637delC	p.Arg213Glyfs*73	del	1	6.5	2	8	1	USA with European ancestry	Abreu [10], 2013
c.482delC	p.Pro161Argfs*10	del	2	6.4	2			Brazil	Macedo [2], 2014
c.478_485del	p.Pro160Cysfs*14	del	1	6.5	3			Italian	Grandone [19], 2015
c.767delA	p.Glu256Glyfs*36	del	1	6	1			Brazil	Macedo [2], 2014
c.802-803del	p.Met268Valfs*23	del	1	3.5	1			European	Simon [18], 2016
c.1172dupA	p.Tyr391*	ins	1	5.95	2			Brazil	Abreu [10], 2013
c.482dupC c.476_476insC	p.Alal62Glyfs*14	ins	11	6.01	14	7.8	3	Brazil (1), USA with European ancestry (1), Germany (1), France + Italy (8)	Abreu [10], 2013, Schreiner [24], 2014, Simon [18], 2016
c.675dupA	p.Gln226Thrfs*6	ins	1	4	1			Brazil	Macedo [2], 2014
c.331G>T	p.Glu111*	ns	1	6.1	1	9	1	Germany	Schreiner [24], 2014
c.841C>T	p.Gly281*	ns	1	6.7	1	unknown	2	Korean	Lee [6], 2015
c.89C>T	p.Pro30Leu	ms	1	5	1			European	Simon [18], 2016
c.203G>A	p.Arg68His	ms	1	7.75	1			Ecuador	Our series
c.935G>A	p.Gly312Asp	ms	1	5.85	2			Greek	Neocleous [21], 2016
c.943A>G	p.Met315Val	ms	1	5.75	2			European	Simon [18], 2016
c.982C>T	p.Arg328Cys	ms	1	6.5	2			European	Simon [18], 2016
c.1018T>G	p.Cys340Gly	ms	1	7.1	1	9.2	1	Greece	Settas [22], 2014
c.1034G>A	p.Arg345His	ms	1	6	1	unknown	1	Danish	Känsäkoski [20], 2015
c.1095G>T	p.Arg365Ser	ms	1	5.95	2	9.7 <sup>a</sup>	1	Belgium	Abreu [10], 2013
c.1118C>T	p.Pro373Leu	ms	1	4.65	2			European	Simon [18], 2016
c.1249T>A	p.Phe417Ile	ms	1	6	1			Brazil	Macedo [2], 2014
c.1260T>G	p.His420Gln	ms	1	5.17	3	9.8 <sup>a</sup>	1	Ashkenazi-Sephardic Jew	De Vries [23], 2014

del, deletion; ins, insertion; ns, nonsense; ms, missense. <sup>a</sup> If the exact age of apparition of symptoms is not known, the age at diagnosis is used for calculations.

could not be checked because the father is currently living in another country and has no contact with the family. Apparently, there were no other cases of ICPP in the family.

In 8 out of 20 (40%) patients, we found the synonymous variant NM\_005664.3:c.663C>T (rs2239669) in *MKRN3*. According to ExAC, the allele frequency of this polymorphism is 0.2815.

In *KISS1*, we found the following polymorphisms in 10 (50%) patients: NM\_002256.3 c.417delA;NP\_002247.3: p.Ter139TrpfsTer8 (rs71745629) (the allele frequency of this polymorphism is 0.2983 [ExAC]) and NM\_002256.3: c.242C>G, NP\_002247.3: p.Pro81Arg (rs4889) (the allele frequency of this polymorphism is 0.3413 [ExAC]).

In 1 patient, we found the SNP NM\_001059.2: c.1345G>A; p.Ala449Thr (rs17033889) in *TACR3*, which

was maternally inherited. According to ExAC, the allele frequency of this polymorphism is 0.00568.

We did not find variants in *KISS1R*, *LIN28*, *GNRH*, *GNRHR*, and *TAC3*.

## Discussion

We describe the first ICPP patient in Spain secondary to a pathogenic variant in *MKRN3*. *MKRN3* pathogenic variants are the most common genetic causes of familial ICPP [18]. Latronico et al. [31] suggest a diagnostic algorithm that includes *MKRN3* analysis in all suspected cases of familial ICPP. In our series, we did not find any pathological variant in the 6 patients with a family history of PP. Surprisingly, we found a missense variant in 1

of the “sporadic” cases. Notably, it is important to point out that the paternal family history was not available. This fact illustrates the potential confounding factors in the study of the genetic basis of ICPP, because recording an accurate pubertal timing history of the male family members is most of the times challenging or even impossible, as male pubertal changes are gradual, so people tend to forget the precise age of puberty onset. Women have an overwhelming pubertal milestone, menarche, which can easily be remembered.

In Table 2, all published *MKRN3* genotypes and their respective phenotypes related to ICPP are presented.

#### *MKRN3 Structure and Mutations*

*MKRN3* is an intronless gene with maternal imprinting, located at chromosome 15: 23,565,678–23,630,075. Disturbance of imprinted gene expression at this region (15q11-q13) causes Prader-Willi syndrome (PWS) [2]. The genes in this region with maternal imprinting are: *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNRPN*, and several snoRNAs, but it is not clear which specific genes are responsible for PWS [2]. Kanber et al. [32] analyzed the genotype of a series of patients with PWS and concluded that neither *MKRN3*, *MAGEL2*, nor *NDN* are implicated in the etiology of PWS.

*MKRN3* gene codifies for MKRN3; the configuration of the protein includes 2 or 3 copies of a C3H motif in the N-terminal, followed by a novel Cys-His configuration, a C3HC4 RING zinc finger, and a final C3H motif [33, 34]. The C3H domain is related to RNA binding, while the RING zinc finger is related to the E3 ubiquitin ligase function [9, 25, 34].

Altogether, 21 pathogenic variants, including 8 indel, 2 nonsense, and 11 missense variants, have been published [2, 10, 16, 18, 24]. Ten of these pathogenic variants (all the indel and nonsense variants) create a truncated protein. The majority of the missense mutations are located in the C3HC4 RING zinc finger domain of the protein as well as in the C3H motif. The variant *MKRN3* NM\_005664.3: c.203G>A;NP\_005655.1:p.Arg68His that is found in our patient is located at the beginning of the protein, where a change from arginine (positively charged) to histidine (polar) could disarrange the protein structure and alter its function. As previously reported, the allele frequency of this variant in the ExAC database is 0.00001678, and it interestingly was present in 2 individuals, 1 of African ethnicity (adjusted allele frequency 0.00009986) and the other of Latin American ethnicity (adjusted allele frequency 0.00008667), both heterozygous, but we have no phenotypic data of these 2 individuals.

Besides, the fact that this gene is maternally imprinted could explain the fact that this variant could be present in an asymptomatic individual.

There is 1 recurrent mutation, c.482insC p.Ala-162Glyfs\*14, present in 11 families [10, 18, 24]. This variant is located in a cytosine homopolymer between nucleotides 476 and 482 and is a potential hotspot [10, 18]. There has been some evidence that girls with *MKRN3* mutations begin puberty earlier than boys [18, 20, 34], but in the majority of the published series, the age of presentation of the male patients was absent or recorded as the age of diagnosis. Therefore, this could be a bias of data recollection, and more studies of phenotype/genotype correlations are needed.

Also, it is important to point out that the frequency of SNP NM\_005664.3:c.663C>T (rs2239669) in our series is 40%, and the expected frequency is 20%. We can speculate that some SNPs, although silent to the protein amino acid chain, could affect the expression or posttranslational features of the gene, leading to a malfunction of the protein.

#### *Other Genes*

We filtered the exome results by a list of genes related to the GnRH pathway (*MKRN3*, *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3*, *TACR3*, *GNRH*, *GNRHR*, and *LIN28*) and found a maternally inherited polymorphism in *TACR3* (rs17033889) in 1 patient. The mother of this individual had pubertal changes at a normal age (data not shown) (PolyPhen2 prediction: benign [score 0.00]; SIFT prediction: tolerated [score 0.44]).

In *KISS1*, we found in half of our sample the variant rs71745629 (NM\_002256.3 c.417delA; NP\_002247.3: p.Ter139TrpfsTer8) and the variant rs4889 (NM\_002256.3: c.242C>G, NP\_002247.3: p.Pro81Arg). Huijbregts et al. [35] described these variants as not correlated with ICPP because (a) rs4889 (p.Pro81Arg) is an SNP that is not located in the critical C-terminal region of the mature peptide necessary for the interaction with *KISS1R*; it was present in 29% of the control group and in 34% of the ICPP group; (b) rs71745629 (p.Ter139TrpfsTer8) is a variant that leads to the synthesis of a prokisspeptin which is 7 residues longer. The half-life of the prohormone might be affected, but not the binding of kisspeptin to the receptor. It was present in 26% of the control group and in only 23% of the ICPP group. In summary, these variants have no major influence on the age of puberty.

In our series, we found that in 5 individuals these variants were present in *cys* because both variants were inherited from the same progenitor. In 1 of the patients, both

variants were de novo, and in the rest of the patients, we were not able to verify the parents' genotype. These results also correspond with those of Huijbregts et al. [35] who found linkage disequilibrium between different variants evaluated.

We did not find any pathogenic variant in the coding region of *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3*, *TACR3*, and *LIN28*. These findings are consistent with the data published by other groups [25, 26, 36–39]. Nonetheless, as we have sequenced the 4,813 OMIM genes, we are developing a further analysis to find any other genes implicated in the neuroregulation of puberty.

Our report has some limitations. We were not able to perform any functional study in order to demonstrate the pathogenicity of the variant *MKRN3* NM\_005664.3: c.203G>A; NP\_005655.1: p.Arg68His. That is why we relied on the theoretical information and the allele frequency to assume the pathogenicity of this variant. In addition, DNA from the father of this patient was not available because he is currently living abroad and it was not possible to obtain a sample. So, the demonstration of paternal inheritance was not possible.

## Conclusion

*MKRN3* is the most frequent genetic cause of familial ICPP, so it is wise to screen for *MKRN3* mutations in all patients with familial ICPP and in patients with an unclear family history, particularly if there is any doubt of the paternal pubertal history. Besides, further studies are necessary in order to clarify the molecular basis of ICPP. Because multiple studies, including this one, failed to demonstrate the presence of pathogenic variants in the coding regions of the genes related to this disease, we assume that it must be caused by alterations of epigenetic or regulatory factors.

## Acknowledgement

This study was financially supported by the Universidad Autónoma de Madrid Foundation: Cátedra de Medicina Genómica Universidad Autónoma de Madrid-Fundación Jiménez Díaz, No. 081800.

We thank the children and their families who participated in the study.

## Disclosure Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- 1 Lomniczi A, Wright H, Ojeda SR: Epigenetic regulation of female puberty. *Front Neuroendocrinol* 2015;36:90–107.
- 2 Macedo DB, Brito VN, Latronico AC: New causes of central precocious puberty: the role of genetic factors. *Neuroendocrinology* 2014;100:1–8.
- 3 Gajdos ZK, Henderson KD, Hirschhorn JN, Palmert MR: Genetic determinants of pubertal timing in the general population. *Mol Cell Endocrinol* 2010;324:21–29.
- 4 Sørensen K, Mouritsen A, Aksglaede L, Hagen CP, Mogensen SS, Juul A: Recent secular trends in pubertal timing: implications for evaluation and diagnosis of precocious puberty. *Horm Res Paediatr* 2012;77:137–145.
- 5 Palmert MR, Hirschhorn JN: Genetic approaches to stature, pubertal timing, and other complex traits. *Mol Genet Metab* 2003;80:1–10.
- 6 Lee H, Jin H-S, Shim Y, Jeong H, Kwon E, Choi V, Kim MC, Chung IS, Jeong SY, Hwang JS: Low frequency of *MKRN3* mutations in central precocious puberty among Korean girls. *Horm Metab Res* 2015;48:118–122.
- 7 Elias C: Leptin action in pubertal development: recent advances and unanswered questions. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:9–15.
- 8 Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK: *TAC3* and *TACR3* mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2008;41:354–358.
- 9 Deshaies RJ, Joazeiro CA: RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 2009;78:399–434.
- 10 Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, Cukier P, Thompson IR, Navarro VM, Gagliardi PC, Rodrigues T, Kochi C, Longui CA, Beckers D, de Zegher F, Montenegro LR, Mendonca BB, Carroll RS, Hirschhorn JN, Latronico AC, Kaiser UB: Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene *MKRN3*. *N Engl J Med* 2013;368:2467–2475.
- 11 Behrends C, Harper JW: Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nat Struct Mol Biol* 2011;18:520–528.
- 12 Carel JC, Leger J: Clinical practice. Precocious puberty. *N Engl J Med* 2008;358:2366–2377.
- 13 Soriano-Guillén L, Corripio R, Labarta JL, Cañete R, Castro-Feijóo L, Espino R, Argente J: Central precocious puberty in children living in Spain: incidence, prevalence, and influence of adoption and immigration. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4305–4113.
- 14 Soriano-Guillén L, Argente J: Central precocious puberty: epidemiology, etiology, diagnosis and treatment. *An Pediatr (Barc)* 2011;74:336.e1–336.e13.
- 15 de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M: Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1794–1800.
- 16 Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, Bianco SD, Kuohung W, Xu S, Gryngarten M, Escobar ME, Arnhold IJ, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC: Mutations of the *KISS1* gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2276–2280.

- 17 Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC: A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 2008;358:709–715.
- 18 Simon D, Ba I, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, Houang M, Jesuran Perelroizen M, de Filippo GP, Salerno M, Simonin G, Reynaud R, Carel JC, Léger J, de Roux N: Mutations in the maternally imprinted gene *MKRN3* are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol* 2016;174:1–8.
- 19 Grandone A, Cantelmi G, Cirillo G, Marzuillo P, Luongo C, Giudice EMD, Perrone L: A case of familial central precocious puberty caused by a novel mutation in the *makorin RING finger protein 3* gene. *BMC Endocrinol Disord* 2015, DOI: 10.1186/s12902-015-0056-8.
- 20 Käsäkoski J, Raivio T, Juul A, Tommiska J: A missense mutation in *MKRN3* in a Danish girl with central precocious puberty and her brother with early puberty. *Pediatr Res* 2015; 78:709–711.
- 21 Neocleous V, Shammas C, Phelan MM, Nicolaou S, Phylactou LA, Skordis N: In silico analysis of a novel *MKRN3* missense mutation in familial central precocious puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2016;84:80–84.
- 22 Settas N, Dacou-Voutetakis C, Karantzis M, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Voutetakis A: Central precocious puberty in a girl and early puberty in her brother caused by a novel mutation in the *MKRN3* gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E647–E651.
- 23 De Vries L, Gat-Yablonski G, Dror N, Singer A, Phillip M: A novel *MKRN3* missense mutation causing familial precocious puberty. *Hum Reprod* 2014;29:2838–2843.
- 24 Schreiner F, Gohlke B, Hamm M, Korsch E, Woelfle J: *MKRN3* mutations in familial central precocious puberty. *Horm Res Paediatr* 2014;82:122–126.
- 25 Krstevska-Konstantinova M, Jovanovska J, Tasic VB, Montenegro LR, Beneduzzi D, Silveira LF, Gucev ZS: Mutational analysis of *KISS1* and *KISS1R* in idiopathic central precocious puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2014;27:199–201.
- 26 Luan X, Zhou Y, Wang W, Yu H, Li P, Gan X, Wei D, Xiao J: Association study of the polymorphisms in the *KISS1* gene with central precocious puberty in Chinese girls. *Eur J Endocrinol* 2007;157:113–118.
- 27 Hernández M, Narvaiza JL, Rincón JM, Ruiz I, Sánchez E, Sobradillo B, Zurimendi A: *Curvas y Tablas de Crecimiento*. Madrid, Editorial Garsi, 1988.
- 28 Marshall WA, Tanner JM: Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969;44:291–303.
- 29 Marshall WA, Tanner JM: Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970;45:13–23.
- 30 Bayley N, Pinneau SR: Tables for predicting adult height from skeletal age: revised for use with the Greulich-Pyle hand standards. *J Pediatr* 1952;40:423–441.
- 31 Latronico AC, Brito VN, Carel J-C: Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016;4:265–274.
- 32 Kanber D, Giltay J, Wiczorek D, Zogel C, Hochstenbach R, Caliebe A, Kuechler A, Horsthemke B, Buiting K: A paternal deletion of *MKRN3*, *MAGEL2* and *NDN* does not result in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 2008;17:582–590.
- 33 Gray TA, Hernandez L, Carey AH, Schaldach MA, Smithwick MJ, Rus K, Marshall Graves JA, Stewart CL, Nicholls RD: The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C3H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. *Genomics* 2000;66:76–86.
- 34 Abreu AP, Macedo DB, Brito VN, Kaiser UB, Latronico AC: A new pathway in the control of the initiation of puberty: the *MKRN3* gene. *J Mol Endocrinol* 2015;54:R131–R139.
- 35 Huijbregts L, Roze C, Bonafe G, Houang M, Le Bouc Y, Carel JC, Leger J, Alberti P, de Roux N: DNA polymorphisms of the *KISS1* 3' untranslated region interfere with the folding of a G-rich sequence into G-quadruplex. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351:239–248.
- 36 Tommiska J, Sørensen K, Aksglaede L, Koivu R, Puhakka L, Juul A, Raivio T: *LIN28B*, *LIN28A*, *KISS1*, and *KISS1R* in idiopathic central precocious puberty. *BMC Res Notes* 2011;4:363.
- 37 Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LF, Jorge AA, Brito VN, Cukier P, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC: Mutational analysis of *TAC3* and *TACR3* genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2012;56: 646–652.
- 38 Leka-Emiri S, Louizou E, Kambouris M, Chrousos G, De Roux N, Kanaka-Gantenbein C: Absence of *GPR54* and *TACR3* mutations in sporadic cases of idiopathic central precocious puberty. *Horm Res Paediatr* 2014;81: 177–181.
- 39 Krstevska-Konstantinova M, Tasic VB, Montenegro LR, Dervisov D, Beneduzzi D, Gontijo LF, Gucev Z: Mutational analysis of *TAC* and *TACR3* in idiopathic central precocious puberty. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)* 2014;35:129–132.

Copyright of Hormone Research in Paediatrics is the property of Karger AG and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

## ANEXO 6 Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales

- 1) Soriano Guillén L., **Ortiz-Cabrera NV**, Riveiro Álvarez R, López Martínez MA, Gavela Pérez T, Trujillo Tiebas MJ. Mutación en el gen *MKRN3* causante de Pubertad Precoz Central Idiopática. En: XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica, 2016 27-29 de abril, Madrid-España. Comunicación tipo póster.
- 2) **Ortiz-Cabrera NV**, Riveiro R, Lopez-Martinez M, Perez-Segura P, Aragon I, Ayuso C, et al. Correlación entre variantes detectadas en genes relacionados con el proceso de pubertad y Pubertad Precoz Central Idiopática. En: Ier Congreso Interdisciplinar de Genética Humana, 2017 25-28 de abril. Córdoba-España. Comunicación tipo póster.
- 3) **Ortiz-Cabrera NV**, Riveiro R, López-Martínez MA, Pérez-Segur P, Aragón I, Ayuso C, Trujillo-Tiebas, MJ, Soriano-Guillén L. Study of genetic basis of Idiopathic Central Precocious Puberty. En: 1st PhD Research Symposium in Health Sciences and Biomedicine. 2018 18 de mayo. Madrid-España. Comunicación oral.
- 4) **Ortiz-Cabrera NV**, Gavela-Pérez T, Pérez-Segura P, Santillán-Coello JM, Trujillo-Tiebas MJ, Soriano-Guillén L. Aproximación al diagnóstico molecular del hipogonadismo hipogonadotrofo congénito aislado con y sin alteración del olfato. Aceptado para ser presentado en: XLI Congreso Sociedad Española Endocrinología Pediátrica, 2019 22-24 mayo. Madrid-España.
- 5) **Ortiz-Cabrera NV**, Riveiro Álvarez R, López Martínez MA, Sánchez Rojo J, Garzón Lorenzo L, Gavela Pérez T, Pérez Segura P, Aragón Gómez I, Soriano Guillén L, Trujillo Tiebas MJ. Searching for genes related to idiopathic central precocious puberty (ICPP) in a Spanish cohort. Aceptado para ser presentado en: European Human Genetics Conference (ESHG), 2019 25-18 de junio. Gothenburg-Suecia.